

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV**



**CONTROL HOMEOSTÁTICO DE LA  
LIBERACIÓN DE GLUTAMATO POR mGluR7.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Ricardo Martín Herranz**

Bajo la dirección del doctor

José Sánchez-Prieto Borja

**Madrid, 2010**

**ISBN: 978-84-693-9493-9**

**© Ricardo Martín Herranz, 2010**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR IV**



**Control homeostático de la liberación de  
glutamato por mGluR7**

**Tesis Doctoral**  
**Ricardo Martín Herranz**  
**Madrid, 2010**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR IV**

# **Control homeostático de la liberación de glutamato por mGluR7**

**Memoria presentada por Ricardo Martín Herranz**

**para optar al grado de Doctor europeo**

**Director de la Tesis: José Sánchez-Prieto Borja**

**Madrid, 2010**

**Vº Bº Director**

**José Sánchez-Prieto Borja**





## ABREVIATURAS

<b>AChasa</b>	acetilcolinestarasa
<b>ADA</b>	adenosina desaminasa
<b><math>\omega</math>-Aga-IVA</b>	$\omega$ -agatoxina-IVA
<b>AMPA</b>	ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazolil-4-propiónico
<b>AMPc</b>	adenosina-3':5'-monofosfato cíclico
<b>AMN 082</b>	dihidrocloruro de N,N'-bis(difenilmetil)-1,2-etanodiamina
<b>4AP</b>	4-aminopiridina
<b>L-AP4</b>	ácido L-2-amino-4-fosfonobutírico
<b>BAPTA-AM</b>	forma permeable, éster acetoximetil, del ácido 1,2 bi-(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético
<b>BSA</b>	albúmina de suero bovino
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>cit</sub></b>	concentración citosólica de Ca <sup>2+</sup>
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>ext</sub></b>	concentración extracelular de Ca <sup>2+</sup>
<b>CHA</b>	ciclohexiladenosina
<b><math>\omega</math>-CoTx-GVIA</b>	$\omega$ -conotoxina-GVIA
<b>CPCCOEt</b>	éster de 7(hidroximino) ciclopropa[b]cromo-1a- carboxilato de etilo
<b>CPPG</b>	(RS)- $\alpha$ -ciclopropil-4-fosfonofenilglicina
<b>cols.</b>	colaboradores
<b>DAG</b>	diacilglicerol
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>EC<sub>50</sub></b>	concentración de agonista que produce el 50% del efecto máximo
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGTA</b>	ácido etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetil éter)- N, N, N', tetraacético
<b>Fura 2-AM</b>	fura-2-penta(acetoximetil)éster
<b>FRET</b>	transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
<b>GABA</b>	ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GAD</b>	glutamato descarboxilasa
<b>GDH</b>	glutamato deshidrogenasa

<b>GIRK</b>	canales responsables de la corriente rectificadora de entrada de K <sup>+</sup> modulados por proteínas G
<b>H-89</b>	N-[2-(( <i>p</i> -bromocinamil)amino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida
<b>HBM</b>	medio tampón HEPES
<b>HEPES</b>	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetil sulfónico
<b>IBMX</b>	3-isobutilmetilxantina
<b>IP<sub>1</sub></b>	inositol monofosfato
<b>IP<sub>3</sub></b>	inositol 1,4,5-trifosfato
<b>KCl</b>	cloruro potásico
<b>LDH</b>	lactato deshidrogenasa
<b>LTD</b>	depresión duradera
<b>LTP</b>	potenciación duradera
<b>mGluR</b>	receptor metabotrópico de glutamato
<b>MPEP</b>	2-metil-6-(feniletinil)piridina
<b>NADP</b>	forma oxidada del dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato
<b>NADPH</b>	forma reducida del dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato
<b>NMDA</b>	ácido N-metil-D-aspartico
<b>PDBu</b>	4-β-forbol-12,13-dibutirato
<b>α-PDD</b>	4-α-forbol-12,13-dibutirato
<b>PKA</b>	proteína quinasa dependiente de AMPc
<b>PKC</b>	proteína quinasa C
<b>PLC</b>	fosfolipasa C
<b>PTx</b>	toxina pertúsica
<b>Ratones α<sub>1B</sub> -/-</b>	ratones modificados genéticamente que carecen de la subunidad principal del canal de Ca <sup>2+</sup> de tipo N
<b>Ratones α<sub>1B</sub> +/+</b>	ratones de tipo silvestre (wild type)
<b>RIM1α</b>	proteína de interacción con Rab3A
<b>SDS</b>	dodecilsulfato sódico
<b>Sp-8-Br-cAMPS</b>	8-bromoadenosina-3'-5'-monofosforotioato cíclico
<b>SQ-22536</b>	9-(tetrahidro-2'-furyl)adenina
<b>TEA</b>	tetraetilamonio
<b>TES</b>	2-[[2-hidroxi-1,1 bis(hidroximetil)etil]amino}etanosulfónico

<b>TRIS</b>	tris(hidroximetil)aminometano
<b>TTx</b>	tetrodotoxina
<b>U-73122</b>	1-[6-((17 $\beta$ -3-Metoxiestra-1, 3, 5(10)-trien-17-il)amino)hexil]- 1H-pirrol-2, 5-diona
<b>U-73343</b>	1-[6-((17 $\beta$ -3-Metoxiestra-1, 3, 5(10)-trien-17-il)amino)hexil]- 1H-pirrolidin-2, 5-diona
<b>vGluT1</b>	transportador vesicular de glutamato 1

# ÍNDICE

<b>SUMMARY.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Results.....</b>	<b>7</b>
2.1. Inhibition of P/Q channels by mGlu7 receptors in hippocampal nerve terminals.....	7
2.2. mGlu 7 receptor inhibits glutamate release both in P/Q-type and N-type Ca <sup>2+</sup> channel containing terminals, but always in the presence of GABA <sub>B</sub> and adenosine A <sub>1</sub> receptors.....	8
2.3. N-type and P/Q-type Ca <sup>2+</sup> channel expressing terminals exhibit different glutamate release properties.....	8
2.4. mGlu7 receptor activates PLC, translocates Munc 13-1 protein and potentiates glutamate release at cerebrocortical nerve terminals.....	9
2.5. Phorbol esters occlude metabotropic mGlu7 receptor-mediated potentiation of glutamate release in cerebrocortical nerve terminals.....	10
<b>3. Concluding remarks.....</b>	<b>11</b>
<b>4. References.....</b>	<b>12</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>1. Los receptores metabotrópicos como moduladores de la liberación de glutamato.....</b>	<b>18</b>
1.1. Receptores metabotrópicos de glutamato.....	18
1.1.1. Receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I.....	19
1.1.2. Receptores metabotrópicos de glutamato del grupo II.....	21
1.1.3. Receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III. mGluR7.....	22
- Estructura e interacción con proteínas.....	23
- Patrón de expresión y localización subcelular.....	27
- Farmacología.....	30
- Mecanismos de señalización.....	32
- Relevancia fisiológica.....	34
1.2. Heterorreceptores.....	36
1.2.1. Receptor GABA <sub>B</sub> .....	36
- Estructura.....	36
- Patrón de expresión y localización subcelular.....	37

- Farmacología.....	37
- Mecanismos de señalización.....	38
- Relevancia fisiológica.....	40
1.2.2. Receptor de adenosina A <sub>1</sub> .....	41
- Farmacología.....	41
- Mecanismos de señalización.....	42
- Relevancia fisiológica.....	43
1.3. Coexistencia y cooperación de los receptores mGluR7, GABA <sub>B</sub> y A <sub>1</sub> en la modulación de la liberación de glutamato.....	44
- Relevancia fisiológica.....	46
<b>2. Canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje.....</b>	<b>47</b>
2.1. Estructura general.....	47
2.2. Clasificación.....	50
- Familia Ca <sub>v</sub> 1 (canales de Ca <sup>2+</sup> de tipo L).....	50
- Familia Ca <sub>v</sub> 2 (canales de Ca <sup>2+</sup> de tipo P/Q, N y R).....	50
- Familia Ca <sub>v</sub> 3 (canales de Ca <sup>2+</sup> de tipo T).....	51
2.3. Regulación de la actividad de los canales de Ca <sup>2+</sup> de la familia Ca <sub>v</sub> 2.....	51
2.4. Función de los canales de Ca <sup>2+</sup> de la familia Ca <sub>v</sub> 2.....	54
<b>3. Modulación de la liberación de glutamato mediante la vía de señalización de PLC.....</b>	<b>56</b>
3.1. PLC.....	56
3.2. PKC.....	59
3.3. Proteínas Munc 13.....	61
- Patrón de expresión y localización subcelular.....	61
- Estructura.....	64
- Función.....	68
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>71</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>75</b>
<b>1. Materiales.....</b>	<b>77</b>
1.1. Animales.....	77
1.2. Reactivos, productos químicos y aparatos.....	77
1.2.1. Genotipado de los ratones.....	77
1.2.2. Obtención de los sinaptosomas.....	78

1.2.3. Determinación de proteínas.....	79
1.2.4. Determinación de la liberación de glutamato.....	79
1.2.5. Inmunocitoquímica.....	81
1.2.6. Determinación de los niveles intrasínaptosomales de AMPc.....	82
1.2.7. Determinación de la concentración citosólica de $\text{Ca}^{2+}$ libre ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ ).....	82
1.2.8. Cuantificación de segundos mensajeros mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia(FRET).....	83
1.2.9. Cuantificación de la translocación de la proteína Munc 13-1.....	83
1.2.10. Experimentos de coimmunoprecipitación.....	85
<b>2..Métodos.....</b>	<b>86</b>
2.1. Genotipado de los ratones.....	86
2.2. El sinaptosoma como modelo de presinapsis <i>in vitro</i> .....	87
2.2.1. Obtención de los sinaptosomas.....	90
2.2.2. Determinación de proteínas (método de Biuret).....	93
2.3. Ensayos de liberación de glutamato.....	94
2.3.1. Inducción de la liberación de glutamato mediante despolarización de los sinaptosomas con KCl.....	94
- Despolarización mediante altas concentraciones de KCl (30 mM).....	94
- Despolarización inducida con bajas concentraciones de KCl (5- 10 mM).....	95
2.3.2. Inducción de la liberación de glutamato mediante despolarización de los sinaptosomas con 4- aminopiridina.....	95
2.3.3. Determinación de la liberación de glutamato.....	96
2.4. Inmunocitoquímica.....	98
2.5. Determinación de los niveles intrasínaptosomales de AMPc.....	100
2.6. Determinación de la concentración citosólica de calcio libre ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ ).....	101

2.7. Cuantificación de segundos mensajeros mediante Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia (FRET).....	104
2.7.1. Determinación de los niveles intrasinápticos de inositol monofosfato (IP1).....	104
2.7.2. Determinación de los niveles intrasinápticos de AMPc ..	109
2.8. Cuantificación de la translocación de la proteína Munc13-1.....	110
2.8.1. Aislamiento de las fracciones soluble y particulada.....	110
2.8.2. Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa de las fracciones soluble y particulada.....	111
2.8.3. Determinación de la actividad acetilcolinesterasa de las fracciones soluble y particulada.....	112
2.8.4. Inmunotransferencia (western blotting).....	113
2.9. Experimentos de coimmunoprecipitación.....	114

#### **IV. RESULTADOS.....119**

##### **1. Modulación de los canales de calcio de tipo P/Q por mGluR7 en terminaciones sinápticas de hipocampo.....121**

1.1. L-AP4 inhibe la liberación de glutamato asociada a canales de tipo N y P/Q en terminaciones sinápticas de hipocampo.....	122
1.2. La reducción en la concentración de Ca <sup>2+</sup> extracelular suprime la contribución de los canales de tipo N a la liberación de glutamato.....	126
1.3. mGluR7 inhibe la liberación de glutamato asociada a los canales de tipo P/Q por de un mecanismo sensible a PTx e independiente de las actividades de PKC y de PKA.....	128
1.4. mGluR7 es el único receptor sensible a L-AP4 que se expresa en terminaciones sinápticas de hipocampo de rata adulta.....	130
1.5. L-AP4 también inhibe la liberación de glutamato acoplada a canales de calcio de tipo P/Q en botones sinápticos de cerebelo de ratón.....	132
1.6. Calmodulina participa en la inhibición del componente P/Q de la liberación de glutamato por mGluR7.....	134
1.7. La inhibición de la liberación de glutamato mediada por mGluR7 no se debe a una disminución de los niveles intracelulares de AMPc.....	135
1.8. mGluR7 reduce la entrada de calcio mediada por canales de calcio de tipo P/Q.....	136
1.9. La reducción de AMPc inducida por mGluR7 afecta a la modulación de la liberación espontánea mediada por canales P/Q.....	137

## **2. La inhibición de la liberación mediada por mGluR7 tiene lugar en botones sinápticos que también expresan receptores GABAB y adenosina A1.....140**

**2.1.** mGluR7 inhibe exclusivamente la liberación de glutamato y la entrada de calcio controladas por canales de calcio de tipo N en terminaciones sinápticas de corteza cerebral de ratón.....142

**2.2.** La expresión de mGluR7 en la corteza cerebral no se altera en los ratones que carecen de canales N.....145

**2.3.** La pérdida del canal de calcio de tipo N no afecta a la inhibición de la adenilato ciclasa por mGluR7.....147

**2.4.** En los botones sinápticos de corteza cerebral, la oclusión de las respuestas de los receptores mGlu7, GABAB y adenosina A1 se limita a la liberación de glutamato mediada por canales de calcio de tipo N.....148

**2.5.** Los receptores mGlu7 modulan la liberación de glutamato y la entrada de calcio asociadas tanto a canales de calcio de tipo N como de tipo P/Q en terminaciones sinápticas de hipocampo de ratón.....152

**2.6.** La oclusión de las respuestas de los receptores mGlu7, GABAB y adenosina A1 también afecta a la liberación de glutamato mediada por canales de calcio de tipo P/Q en botones sinápticos de hipocampo.....156

## **3. Propiedades diferenciales de los botones sinápticos que expresan canales de calcio de tipo N ó canales de tipo P/Q.....159**

**3.1.** Los canales de calcio de tipo N están peor acoplados a la exocitosis de glutamato que los canales de tipo P/Q.....160

**3.2.** Los botones sinápticos con canales de calcio de tipo N presentan mayor facilitación de la liberación por ésteres de forbol.....162

**3.3.** La pérdida del canal de calcio de tipo N no alteró la sensibilidad al calcio de la maquinaria exocitótica.....165

## **4. Facilitación de la liberación de glutamato por mGluR7.....167**

**4.1.** La exposición prolongada al agonista L-AP4 hizo patente una respuesta facilitadora mediada por mGluR7.....168

**4.2.** Farmacología de la potenciación inducida por L-AP4.....172

**4.3.** La modulación de la liberación por mGluR7 es un balance entre sus acciones inhibitoras y facilitadoras.....176

**4.4.** La estimulación prolongada de mGluR7 incrementó los niveles de inositol monofosfato (IP1).....178

**4.5.** mGluR7 induce la translocación a membrana de Munc 13-1.....181



4.6. Coinmunoprecipitación de mGluR7 y Munc 13-1.....	184
4.7. La estimulación prolongada del receptor GABAB también potencia la liberación de glutamato y la acumulación de IP1.....	186
4.8. La coadición de los agonistas CHA, baclofén y L-AP4 facilita la liberación de glutamato a concentraciones que no tienen efecto aplicadas por separado.....	187
<b>5. Oclusión de la facilitación por mGluR7 por los ésteres de forbol.....</b>	<b>190</b>
5.1. La potenciación de la liberación mediada por ésteres de forbol y L-AP4 se ocluyen.....	190
5.2. Pérdida de la potenciación de la liberación por L-AP4 y por ésteres de forbol en botones sinápticos carentes del canal de calcio de tipo N.....	193
5.3. Los ratones que carecen de canales N tienen una expresión normal de Munc 13-1 y de Munc 13-2.....	195
5.4. La pérdida del canal de calcio de tipo N no altera la coexpresión de mGluR7 con Munc 13-1 ó Munc 13-2.....	198
5.5. La potenciación de la liberación mediada por ésteres de forbol muestra una diferente dependencia de $[Ca^{2+}]_{ext}$ en las terminaciones nerviosas con canales N y P/Q.....	201
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>205</b>
<b>1. Modulación de canales P/Q por mGluR7 en el hipocampo.....</b>	<b>207</b>
1.1. mGluR7 es el receptor responsable de las respuestas a L-AP4.....	207
1.2. mGluR7 inhibe el componente de liberación de glutamato asociado a canales de calcio de tipo P/Q.....	208
1.3. Mecanismo de inhibición de la liberación por mGluR7: canales de $Ca^{2+}$ de tipo P/Q y AMPc.....	209
<b>2. mGluR7 inhibe la liberación de glutamato tanto en botones sinápticos con canales N como P/Q, pero siempre va acompañado de los receptores GABAB y adenosina A1.....</b>	<b>211</b>
<b>3. Propiedades diferenciales de la liberación en botones sinápticos que expresan canales N ó canales P/Q.....</b>	<b>215</b>
3.1. mGluR7 inhibe la liberación mediada por canales P/Q en el hipocampo pero no en la corteza cerebral.....	215
3.2. El peor acoplamiento de los canales de calcio de tipo N a la liberación de glutamato es una propiedad intrínseca independiente de la inhibición por proteínas G.....	216

3.3. La liberación de glutamato mediada por canales N es más susceptible a la facilitación por PKC.....	217
<b>4. mGluR7 potencia la liberación de glutamato.....</b>	<b>218</b>
4.1. mGluR7 activa PLC.....	219
4.2. La modulación de la liberación que ejerce mGluR7 es un balance entre inhibición y facilitación.....	220
4.3. Participación de la proteína Munc 13-1.....	221
4.4. Relevancia fisiológica de la vía facilitadora de mGluR7.....	223
4.5. La modulación dual de la liberación no es una característica exclusiva de mGluR7.....	224
<b>5. Los ésteres de forbol ocluyen la potenciación de mGluR7.....</b>	<b>225</b>
5.1. La potenciación de mGluR7 se pierde en ratones que carecen de canales N.....	226
5.2. La potenciación por ésteres de forbol tiene el mismo perfil farmacológico que la mediada por mGluR7.....	227
5.3. Los ésteres de forbol también potencian la liberación en botones sinápticos con canales P/Q, pero sólo a baja $[Ca^{2+}]_{ext}$ .....	228
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>231</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>235</b>

## **SUMMARY**

## 1. Introduction.

Metabotropic glutamate receptors belong to the G protein coupled receptors (GPCRs) superfamily and their eight receptor subtypes (mGlu 1-8 receptors) are classified into three major groups. Three different subtypes of Group III metabotropic glutamate receptors are expressed in the brain (mGlu4, 7 and 8 receptors) and they are localized within the presynaptic active zone of glutamatergic nerve terminals (Bradley *et al.*, 1996; Shigemoto *et al.*, 1996). At these excitatory synapses, group III mGlu receptors act as autoreceptors mediating feedback inhibition of glutamate release (Forsythe & Clements, 1990; Trombley & Westbrook, 1992; Gereau & Conn, 1995; Herrero *et al.*, 1996; Millán *et al.*, 2002a; Ladera *et al.*, 2007). The signalling mechanism initiated by mGlu7 receptors to inhibit neurotransmitter release involves the activation of Gi/o proteins that inhibit Ca<sup>2+</sup> channels and adenylylcyclase (Okamoto *et al.*, 1994; Conn & Pin, 1997), and probably the release process itself (Blackmer *et al.*, 2005). The inhibition of the evoked release of glutamate has primarily been associated with the inhibition of the Ca<sup>2+</sup> channels by the  $\beta\gamma$  subunits released from the heteromeric G protein complex (O'Connor *et al.*, 1999; Millán *et al.*, 2002a). The binding of calmodulin to the C-tail of mGlu7 receptor is required for the release of  $\beta\gamma$  subunits and for the subsequent auto-inhibition of synaptic transmission (O'Connor *et al.*, 1999). In addition, calcium and phospholipid-dependent protein kinase (PKC)-mediated phosphorylation of mGlu7 receptor inhibits the binding of calmodulin (Nakajima *et al.*, 1999; Airas *et al.*, 2001), consistent with the PKC-dependent suppression of group III mGlu receptors activity (Herrero *et al.*, 1996; Macek *et al.*, 1998; Millán *et al.*, 2002a).

Neurotransmitter release at glutamatergic synapses depends primarily on the activity of P/Q- and N-type Ca<sup>2+</sup> channels (Luebke *et al.*, 1993; Mintz *et al.*, 1995; Turner & Dunlap, 1995; Vázquez & Sánchez-Prieto, 1997). The release component mediated by N-type Ca<sup>2+</sup> channels is inhibited by mGlu7 receptors (Millán *et al.*, 2002a; Capogna, 2004). Indeed, this receptor response is suppressed by antagonists of calmodulin and by PKC activation (Millán *et al.*, 2002a, Capogna, 2004). However, in cultured cerebellar granule cells, a new signalling mechanism by which mGlu7 receptors modulate somatic P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels has been identified; it involves phospholipase C (PLC) and PKC activation (Perroy *et al.*, 2000). Nevertheless, the modulation of P/Q channels by synaptic mGlu7 receptors may differ from somatic receptors because PKC activation suppresses group III mGlu receptor responses at hippocampal synapses, where synaptic transmission is largely supported by P/Q channels

(Wheeler *et al.*, 1994; Macek *et al.*, 1998). For these reasons, in the present work, we have studied the mechanism by which mGlu7 receptors inhibit the release component coupled to P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in hippocampal nerve terminals.

mGlu7 is not the only G-protein coupled receptor which inhibits excitatory transmission. Adenosine  $\text{A}_1$  and  $\text{GABA}_\text{B}$  receptors also inhibit glutamatergic transmission acting as heteroreceptors (Wu & Saggau, 1994, 1995), and these receptors also activate signalling pathways negatively coupled to  $\text{Ca}^{2+}$  channels and adenylyl cyclase (Yawo & Chuhma, 1993; Millán *et al.*, 2002a, 2003). By combining  $\text{Ca}^{2+}$  imaging and immunocytochemistry, we have already showed that  $\text{A}_1$ ,  $\text{GABA}_\text{B}$  and mGlu7 receptors coexist in a subpopulation of cerebrocortical nerve terminals (Ladera *et al.*, 2007). As these receptors inhibit glutamate release through common intracellular signalling pathways, their co-activation occluded the responses of each other (Ladera *et al.*, 2007). It seems likely that the co-expression of these three receptors occurs at nerve terminals with N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, as blocking these channels with  $\omega$ -conotoxin-GVIA fully occluded the inhibition of release by these receptors (Millán *et al.*, 2002a, 2003; Ladera *et al.*, 2007). Indeed, G protein coupled receptors preferentially inhibit N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels (Zhang *et al.*, 1996; Currie & Fox, 1997; González-Inchauspe *et al.*, 2007). To determine whether the occlusion of  $\text{A}_1$ ,  $\text{GABA}_\text{B}$  and mGlu7 receptor responses is restricted to the glutamate release mediated by N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, in this work, we have analyzed this process in nerve terminals from mice lacking the  $\alpha_{1\text{B}}$  subunit ( $\text{Ca}_\text{v}2.2$ ) of these channels.

As it has already been mentioned, glutamate release depends primarily on N-type and P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. These channels are heterogeneously distributed at nerve terminals (Luebke *et al.*, 1993; Vázquez & Sánchez-Prieto, 1997). While only N-type or P/Q-type channels contribute to transmitter release at some nerve terminals, both subtypes are active at others (Millán *et al.*, 2002b; Reid *et al.*, 2003). This heterogeneous distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  channels occurs early during development, as can be seen at the calyx of Held (Wu *et al.*, 1999; González-Inchauspe *et al.*, 2007) and at other synapses (Iwasaki *et al.*, 2000). However, as development proceeds, the contribution of N-type channels to release diminishes, glutamate release relying exclusively on P/Q-type channels at mature synapses. Thus, there is a change in the mode of release during the development of the calyx of Held, from cooperative action of many channel types loosely coupled to release (N, P/Q and R channels) to a mode of release in which fewer tightly-coupled P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels open, inducing efficient neurotransmitter release (Fedchyshyn & Wang, 2005). Nonetheless, at

cerebrocortical synapses, substantial glutamate release is still governed by N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in adult animals (Iwasaki *et al.*, 2000; Vázquez & Sánchez-Prieto, 1997; Millán *et al.*, 2002a, 2003).  $\text{Ca}^{2+}$  imaging of single nerve terminals reveals that N- and P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels are segregated and that they are expressed in different subpopulation of nerve terminals. To determine whether the glutamate release mediated by these channels exhibit distinct properties, in this work, we have isolated each release component in cerebrocortical nerve terminals from wild-type mice by specifically blocking N-type calcium channels with  $\omega$ -conotoxin-GVIA and P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels with  $\omega$ -agatoxin-IVA. In addition, we have determined the release properties at terminals from mice lacking the  $\alpha_{1B}$  subunit of N-type channels ( $\text{Ca}_v2.2$ ) to test the possibility that P/Q-type channels can compensate for the loss of N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels.

As already mentioned transfected mGlu7 receptors expressed in the soma of cerebellar granule cells can activate phospholipase C (PLC) and the subsequent hydrolysis of phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) thereby generating inositol trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ), that releases  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores, and diacylglycerol (DAG), that activates protein kinase C (PKC) (Perroy *et al.*, 2000). However, one important question that remains to be resolved is whether endogenous mGlu7 receptors at synaptic sites also signal via PLC and if so, what effect has such signalling on release modulation.

Phorbol esters, stable analogues of the endogenous product of PLC, DAG, potentiate synaptic transmission by increasing neurotransmitter release (Herrero *et al.*, 1992; Parfitt & Madison, 1993; Stea *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2001; Stevens & Sullivan, 1998; Wu & Wu, 2001; Rhee, 2001; Wierda *et al.*, 2007). DAG signaling at synapses has long been thought to be mediated by protein kinase C (PKC) and both presynaptic  $\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels as well as other proteins of the release machinery, have been identified as PKC-substrates. In addition to PKC activation, phorbol esters can also activate munc13-1, a presynaptic protein with an essential role in synaptic vesicle priming (Betz *et al.*, 1998; Rhee *et al.*, 2002). However, there is little information regarding the presynaptic receptors coupled to signaling pathways involved in synaptic potentiation. Presynaptic PLC activation in response to high frequency stimulation results in synaptic potentiation due to increased neurotransmitter release in hippocampal neurons (Rosenmund *et al.*, 2002). As high frequency stimulation increases synaptic glutamate enough to activate low affinity mGlu7 receptors (Pelkey *et al.*, 2005), it remains unclear whether mGlu7 receptors may activate presynaptic PLC and whether this action enhances glutamate release. For these reasons, in this work, we have studied whether mGlu7 receptors activate phospholipase C in

cerebrocortical nerve terminals and whether this activation potentiates glutamate release. Moreover, if mGlu7 is able to activate PLC and increase DAG, it is possible that this receptor acts through the same mechanism as phorbol esters. Therefore, here we have analyzed whether the responses produced by mGlu7 receptor and phorbol esters occlude each other.

## 2. Results.

### 2.1. Inhibition of P/Q channels by mGlu7 receptors in hippocampal nerve terminals.

In hippocampal nerve terminals from adult rats, only high concentration of the Group III mGlu receptors agonist, L-AP4 (1mM) reduces KCl evoked glutamate release, indicating that a low affinity receptor such as mGlu7 receptor (Okamoto *et al.* 1994) is responsible for most of this glutamate release inhibition. This is consistent with the immunocytochemistry data showing that, among the group III mGlu receptors expressed in the brain, only mGlu7 receptor is relatively abundant in the preparation of hippocampal synaptosomes.

In this preparation of hippocampal nerve terminals, the blockade of N- and P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels with  $\omega$ -conotoxin-GVIA and  $\omega$ -agatoxin-IVA, respectively, shows that P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels support the major component of glutamate release, while the remaining release is supported by N-type channels. mGlu7 receptor inhibits KCl-evoked glutamate release in the presence of  $\omega$ -conotoxin-GVIA and after decreasing the extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration to abolish the contribution of N-type channels, because these channels support release with less efficiency than P/Q channels. Under this low extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  condition, L-AP4 (1 mM) reduces the evoked glutamate release by  $35 \pm 2\%$ . This inhibition is largely prevented by pertussis toxin, but it is insensitive to inhibitors of protein kinase C (bisindolylmaleimide) and protein kinase A (H-89). In addition to this, this response is blocked by the calmodulin antagonist, calmidazolium and is associated with a reduction in the  $\text{Ca}^{2+}$  influx mediated by P/Q channels in the absence of any detectable change in cAMP levels. However, L-AP4 decreases the levels of cAMP after adenylyl cyclase activation by forskolin, and the activation of this additional signalling pathway is very efficient in counteracting the facilitation of glutamate release induced by forskolin.



## **2.2. mGlu 7 receptor inhibits glutamate release both in P/Q-type and N-type $\text{Ca}^{2+}$ channel containing terminals, but always in the presence of $\text{GABA}_B$ and adenosine $A_1$ receptors.**

It is known that in cerebrocortical nerve terminals, inhibition of glutamate release by mGlu7 receptor is restricted to N-type channel expressing terminals (Millán *et al.*, 2002a). In this work, we have reported that in cerebrocortical synaptosomes of mice lacking the  $\alpha_{1B}$  subunit of N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, in which release is supported exclusively by P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, mGlu7 receptor mediated glutamate release inhibition is lost. Furthermore, there is no occlusion of the release inhibition by  $\text{GABA}_B$  and adenosine  $A_1$  receptors. Hence in the cerebrocortical preparation, these three receptors only seem to coexist in N-type channel containing terminals. In contrast, in hippocampal nerve terminals of these knock-out mice, in which mGlu7 receptor can inhibit P/Q-type channels, we have observed the occlusion of inhibitory responses by co-stimulation of adenosine  $A_1$ ,  $\text{GABA}_B$  and mGlu7 receptors.

## **2.3. N-type and P/Q-type $\text{Ca}^{2+}$ channel expressing terminals exhibit different glutamate release properties.**

As we have already observed, mGlu7 receptor mediated glutamate release inhibition at cerebrocortical nerve terminals is lost in mice lacking the  $\alpha_{1B}$  subunit of N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. However, this is not due to a lack of mGlu7 receptor expression, as we have seen that mGlu7 receptor expression is similar in wild-type and knock-out mice. This is consistent with the fact that other responses mediated by this same receptor, such as the inhibition of forskolin induced glutamate release, are still present in mice lacking the  $\alpha_{1B}$  subunit of N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels.

Blocking N-type calcium channel with  $\omega$ -conotoxin-GVIA and P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels with  $\omega$ -agatoxin-IVA, we have observed that N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel mediated glutamate release is more sensitive to reductions in the extracellular calcium concentration. Although we have previously described that N-type channels are more strongly inhibited by G protein coupled receptors than P/Q-type channels, this is not the cause of the weaker coupling to glutamate release of N-type channels, because the addition of pertussis toxin does not alter this property.

Another differential feature of N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel mediated release is its modulation by protein kinase C. Thus, glutamate release in both wild-type

terminals in the presence of  $\omega$ -conotoxin-GVIA and in mice lacking N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, is less facilitated by protein kinase C, indicating that N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels show higher susceptibility to PKC facilitation.

#### **2.4. mGlu7 receptor activates PLC, translocates Munc 13-1 protein and potentiates glutamate release at cerebrocortical nerve terminals.**

We have observed that, in cerebrocortical synaptosomes, after long pre-treatment with the agonist L-AP4 (10 minutes, 1 mM), mGlu7 receptor mediated inhibition of KCl-evoked glutamate release induced by a second addition of L-AP4, is lost. This is not due to a desensitization of the receptor because the second addition of L-AP4 still inhibits KCl evoked  $\text{Ca}^{2+}$  influx. This loss of mGlu7 receptor mediated inhibition is due to the appearance of a new responses consisting of an increase in glutamate release which counterbalances the inhibition. As release inhibition is mediated by impaired calcium channel activity, release facilitation was separated from its inhibition by inducing release with the calcium ionophore ionomycin, which inserts into the membrane and delivers calcium independently of calcium channels. The pre-treatment with L-AP4 also increases ionomycin induced glutamate release, indicating that this facilitatory response is independent of  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity, but dependent of downstream exocytotic release machinery.

We have confirmed that the loss of glutamate release inhibition is the consequence of development of release facilitation, as the reduction of the mGlu7 receptor mediated potentiation by phospholipase C inhibitors or by diminished L-AP4 concentration of pre-treatment, rescue the inhibition by a second addition of L-AP4. Therefore, mGlu7 receptor exerts a bidirectional control of glutamate release which might serve to glutamate homeostasis.

The mGlu7 receptor mediated potentiation resists exposure to pertussis toxin, but is sensitive to phospholipase C inhibitors (U-73122). Furthermore, this response depends on phosphatidyl inositol (4,5)-bisphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) hydrolysis as we have seen that prolonged treatment with L-AP4 increases inositol monophosphate ( $\text{IP}_1$ ) accumulation, which can be measured in the presence of lithium chloride instead of inositol trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ), which is rapidly dephosphorylated. Moreover, the potentiation of release does not depend on protein kinase C, as it is insensitive to PKC specific inhibitor, bisindolylmaleimide, but it is blocked by the diacylglycerol-binding site antagonist, calphostin C, which also inhibits non kinase proteins such as Munc 13 proteins, active zone proteins essential for vesicle priming involved in neurotransmitter release potentiation. We have also found that the activation of

mGlu7 receptor translocates Munc 13-1 protein from soluble to particulate fraction. In addition to this, mGlu7 receptor and Munc 13-1 protein co-immunoprecipitate each other indicating that these proteins assemble into stable protein-protein complexes which might be physiologically relevant *in vivo*.

The bidirectional control of glutamate release is not an exclusive property of mGlu7 receptor. Thus, we have observed that other presynaptic receptors as GABA<sub>B</sub>, which inhibit glutamate release, also enhance glutamate release as well as inositol monophosphate (IP<sub>1</sub>) accumulation, although in this case, a G protein sensitive to pertussis toxin is involved in both responses. Given that adenosine A<sub>1</sub>, GABA<sub>B</sub> and mGlu7 receptors cooperate to inhibit glutamate release (Ladera *et al.*, 2007), we analyzed whether they also cooperate to potentiate release. To test this, we have activated these three receptors simultaneously with low agonist concentrations which don't have any effect when added alone and we have observed that these receptors cooperate to increase glutamate release.

## **2.5. Phorbol esters occlude metabotropic mGlu7 receptor-mediated potentiation of glutamate release in cerebrocortical nerve terminals.**

We have observed that the potentiation of glutamate release mediated by mGlu7 and by phorbol esters show a similar pharmacological profile: they are both insensitive to the protein kinase C specific inhibitor, bisindolylmaleimide, but they are blocked by the diacylglycerol-binding site antagonist, calphostin C, which also inhibits non kinase proteins such as Munc 13 proteins. This indicates that both responses share the same signalling pathway. This is confirmed by the fact that the pre-treatment with both phorbol esters and L-AP4 produces a response similar to that produced by each treatment alone.

L-AP4 and phorbol esters mediated potentiations are restricted to release sites that express N-type Ca<sup>2+</sup> channels as PDBu mediated and mGlu7 receptor mediated potentiations are absent in nerve terminals from mice lacking N-type Ca<sup>2+</sup> channels. However, PDBu but not mGlu7 receptor potentiates glutamate release at nerve terminals with P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels but only under restricted conditions of calcium influx (0.1 mM extracellular Ca<sup>2+</sup>). The differential effect of phorbol esters in nerve terminals with N- and P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels seems to be unrelated to Munc 13 isoforms, as both types of nerve terminals express Munc 13-1 and Munc 13-2 but we cannot rule out the possibility that it depends on other properties of the release machinery.

### 3. Concluding remarks.

- 3.1. mGlu7 receptor inhibits P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels mediated glutamate release via a membrane delimited mechanism which implies Gi/o proteins but not PKC nor PLC. mGlu7 also reduces cAMP levels, which in turn affects glutamate release.
- 3.2. mGlu 7 receptor inhibits glutamate release both in P/Q-type and N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel containing terminals, but always in the presence of  $\text{GABA}_B$  and adenosine  $A_1$  receptors.
- 3.3. P/Q-type and N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels expressing terminals show different glutamate release properties as N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels are less well coupled to glutamate release and show a higher inhibition by G protein coupled receptors than P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels.
- 3.4. mGlu7 receptor activates PLC, translocates Munc 13-1 protein and potentiates glutamate release. This facilitatory response allows mGlu7 receptor to exert a bidirectional control of glutamate release, which may be of importance in glutamate homeostasis.
- 3.5. The mGlu7 receptor and phorbol esters mediated potentiation of glutamate release have a common intracellular pathway and occlude each other. Furthermore, phorbol esters but not, mGlu7 receptors, potentiate release at nerve terminals that express P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels exclusively at low extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  conditions.

## 4. References.

- Airas, J.M., Betz, H. and El Far, O. (2001). PKC phosphorylation of a conserved serine residue in the C terminus of group III metabotropic glutamate receptors inhibits calmodulin binding. *FEBS Lett.* **494**, 60–63.
- Betz A, Ashery U, Rickmann M, Augustin U, Neher E, Südhof TC, Rettig J, Brose N (1998). Munc-13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitters release. *Neuron* **21**, 123–136.
- Blackmer, T., Larsen, E.C., Bartleson, C., Kowalchyk, J.A., Yoon, E-J., Preininger, A.M., Alford, S., Hamm, H.E. and Martin, T.F.J. (2005). G protein betagamma directly regulates SNARE protein fusion machinery for secretory granule exocytosis. *Nat. Neurosci.* **8**, 421–434.
- Bradley, S., Levey, A.I., Hersch, S.M. and Conn, J.P. (1996). Immunocytochemical localization of group III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus with subtype-specific antibodies. *J. Neurosci.* **16**, 2044–2056.
- Capogna, M. (2004). Distinct properties of presynaptic group II and III metabotropic glutamate receptor-mediated inhibition of perforant pathway- CA1 EPSCs. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 2847–2858.
- Conn, P.J. and Pin, J.P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 205–237.
- Currie, K.P. and Fox, A.P. (1997). Comparison of N- and P/Q-type voltage-gated calcium channel current inhibition. *J. Neurosci.* **17**, 4570–4579.
- Fedchyshyn, M.J. & Wang, L-W. (2005). Developmental transformation of the release modality at the Calyx of Held synapse. *J. Neurosci.* **25**, 4131–4140.
- Forsythe, I.D. and Clements, J.D. (1990). Presynaptic glutamate receptors depress excitatory monosynaptic transmission between mouse hippocampal neurones. *J. Physiol. (Lond.)* **429**, 1–16.
- Gereau, I.V., R.W. and Conn, J.P. (1995). Multiple presynaptic metabotropic glutamate receptors modulate excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal area CA1. *J. Neurosci.* **15**, 6879–6889.
- González-Inchauspe, C., Forsythe, I.D. and Uchitel, O.D. (2007). Changes in synaptic transmission properties due to the expression of N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels at the calyx of Held synapse of mice lacking P/Q-type calcium channels. *J. Physiol.* **584**, 835–851.
- Herrero, I., Miras-Portugal, M.T. and Sánchez-Prieto, J. (1992). Activation of protein kinase C by phorbol esters and arachidonic acid required for the optimal potentiation of glutamate exocytosis. *J. Neurochem.* **59**, 1574–1577.
- Herrero, I., Vazquez, E., Miras-Portugal, M.T. and Sánchez-Prieto, J. (1996). A decrease in  $[\text{Ca}^{2+}]$  but not in cAMP mediates L-AP4 inhibition of glutamate release: PKC-mediated suppression of this inhibitory pathway. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 700–709.
- Iwasaki, S., Momiyama, A., Uchitel, O.D. and Takahashi, T. (2000). Developmental changes in calcium channels types mediating central synaptic transmission. *J. Neurosci.* **20**, 59–65.
- Ladera, C., Godino, M.C., Martín, R., Luján, R., Shigemoto, M., Ciruela, F., Torres, M. and Sánchez-Prieto, J. (2007). The coexistence of multiple receptors in a single nerve terminal provides evidence for presynaptic integration. *J. Neurochem.* **103**, 2314–2326.
- Luebke, J.I., Dunlap, K. and Turner, T.J. (1993). Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron* **11**, 895–902.
- Macek, T.A., Schaffhouser, H. and Conn, P.J. (1998). Protein kinase C and A3 adenosine receptor binding activation inhibit presynaptic metabotropic glutamate receptor (mGluR) function and uncouple mGluRs from GTP binding proteins. *J. Neurosci.* **18**, 6138–6146.

- Millán, C., Luján, R., Shigemoto, R. and Sánchez-Prieto, J. (2002a). The inhibition of glutamate release by mGluR7 affects both  $[Ca^{2+}]_c$  and cAMP: evidence for a strong inhibition of  $Ca^{2+}$  entry in single nerve terminals. *J. Biol. Chem.* **277**, 14092–14101.
- Millán, C., Luján, R., Shigemoto, R. and Sánchez-Prieto, J. (2002b). Subtypespecific expression of group III metabotropic glutamate receptors and  $Ca^{2+}$  channels in single nerve terminals. *J. Biol. Chem.* **277**, 47796–47803.
- Millán, C., Castro, E., Torres, M., Shigemoto, R., Sánchez-Prieto, J. (2003). Co-expression of metabotropic glutamate receptor 7 and N-type  $Ca^{2+}$  channels in single cerebrocortical nerve terminals of adult rats. *J. Biol. Chem.* **278**, 23955–23962.
- Mintz, I.M., Sabatini, B.L. and Regher, W.G. (1995). Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron* **15**, 675–688.
- Nakajima, Y., Yamamoto, T., Nakayama, T. & Nakanishi, S. (1999). A relationship between protein kinase C phosphorylation and calmodulin binding to the metabotropic glutamate. *J. Biol. Chem.*, **27**, 27573–27577.
- O'Connor, V., El Far, O., Bodill-Cardona, E., Nanoff, C., Freissmuth, M., Karschin, M., Airas, J., Betz, H. and Boehm, S. (1999). Calmodulin dependence of presynaptic metabotropic glutamate receptor signaling. *Science* **286**, 1180–1184.
- Okamoto, N., Hori, S., Akazawa, C., Hayashi, Y., Shigemoto, R., Mizuno, N. and Nakanishi, S. (1994). Molecular characterization of a new metabotropic glutamate receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP signal transduction. *J. Biol. Chem.* **269**, 1231–1236.
- Parfitt, K.D. and Madison, D.V. (1993). Phorbol esters enhance synaptic transmission by a presynaptic, calcium-dependent mechanism in rat hippocampus. *J. Physiol.* **526**, 349–357.
- Pelkey, K., Lavezzi, G., Racca, C., Roche, K.W. and McBain, C.J. (2005). mGluR7 is a metaplastic switch controlling bi-directional plasticity of feedforward inhibition. *Neuron* **46**, 89–102.
- Perroy, J., Prezeau, L., De Waard, M., Shigemoto, R., Bockaert, J. and Fagni, L. (2000). Selective blockade of P/Q-type  $Ca^{2+}$  channels by the metabotropic glutamate receptor type 7 involves a phospholipase C pathway in neurons. *J. Neurosci.* **20**, 7896–7904.
- Reid, C., Bekkers, J.M. and Clements, J.C. (2003). Presynaptic  $Ca^{2+}$  channel: a functional patchwork. *Trends Neurosci.* **26**, 683–687.
- Rhee, S-G. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 281–312.
- Rhee, J-S., Betz, A., Pyott, S., Reim, K., Varoqueaux, F., Augustin, I., Hesse, D., Südhof, T.C., Takahashi, M., Rosenmund, C. and Brose, N. (2002). Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs. *Cell* **108**, 121–133.
- Rosenmund, C., Sigler, A., Augustin, I., Reim, K., Brose, N. and Rhee, J-S. (2002). Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms. *Neuron* **33**, 411–421.
- Shigemoto, R., Kulik, A., Roberts, J.D.B., Ohishi, H., Nusser, Z., Kaneko, T. and Somogyi, P. (1996). Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* **381**, 523–525.
- Stea, A., Soong, T.W. and Snutch, T.P. (1995). Determinants of PKC-dependent modulation of a family of neuronal calcium channels. *Neuron* **15**, 929–940.
- Stevens, C.F. and Sullivan, J.M. (1998). Regulation of the readily releasable vesicle pool by protein kinase C. *Neuron* **21**, 885–893.
- Trombley, P.Q. and Westbrook, G.L. (1992). L-AP4 inhibits calcium currents and synaptic transmission via a G-protein-coupled glutamate receptor. *J. Neurosci.* **12**, 2043–2050.

- Turner, L.O. and Dunlap, K. (1995). Pharmacological characterization of presynaptic calcium channels using subsecond biochemical measurements of synaptosomal neurosecretion. *Neuropharmacology* **34**, 1469–1478.
- Vázquez, E. and Sánchez-Prieto, J. (1997). Presynaptic modulation of glutamate release targets different calcium channels in rat cerebrocortical nerve terminals. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 2009–2018.
- Wheeler, D.B., Randall, A. and Tsien, R.W. (1994). Roles of N-type and Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* **264**, 107–111.
- Wierda, K.D., Toonen, R.F., de Wit, H., Brussaard, A.B. and Verhage, M. (2007). Interdependence of PKC-dependent and PKC-independent pathways for presynaptic plasticity. *Neuron* **54**, 275–290.
- Wu, L.-G. and Saggau, P. (1994). Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of hippocampus. *Neuron* **12**, 1139–1148.
- Wu, L.-G. and Saggau, P. (1995). GABA<sub>B</sub> receptor mediated presynaptic inhibition in guinea pig hippocampus is caused by a reduction of presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *J. Physiol.* **485**, 649–657.
- Wu, L.-G., Westenbroek, R.E., Borst, J.G.G., Catterall, W.A. and Sakmann, B. (1999). Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single Calyx-type synapses. *J. Neurosci.* **19**, 726–736.
- Wu, X.-S., Wu, L.-G. (2001). Protein kinase C increases the apparent affinity of the release machinery to  $\text{Ca}^{2+}$  by enhancing the release machinery downstream of the  $\text{Ca}^{2+}$  sensor. *J. Neurosci.* **21**, 7928–7936.
- Yawo, H. and Chuhma, N. (1993). Preferential inhibition of  $\omega$ -conotoxin-sensitive presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  channels by adenosine autoreceptors. *Nature* **365**, 256–258.
- Zhang, J.F., Ellinor, P.T., Aldrich, R.W. and Tsien, R.W. (1996). Multiple structural elements in voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels support their inhibition by G proteins. *Neuron* **17**, 991–1003.
- Zhang, Y.H., Kenyon, J.L. and Nicol, G.D. (2001). Phorbol ester-induced inhibition of potassium currents in rat sensory neurons requires voltage-dependent entry of calcium. *J. Neurophysiol.* **85**, 362–373.

## **I. INTRODUCCIÓN**



Las sinapsis glutamatérgicas constituyen el principal sistema de neurotransmisión excitadora del sistema nervioso central. Si bien los cambios duraderos en la transmisión sináptica glutamatérgica tienen un papel esencial en los procesos de aprendizaje y memoria cerebrales, la desregulación de éstos puede dar lugar a patologías como la isquemia cerebral o a procesos neurodegenerativos (como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington o esclerosis lateral amiotrófica), dependiendo de si dicha desregulación presenta un curso temporal agudo o crónico.

Como sinapsis química que es, la transmisión sináptica glutamatérgica depende de la liberación de un neurotransmisor (en este caso glutamato) desde la terminación nerviosa presináptica, que difunde en la hendidura sináptica y se une a receptores específicos de la neurona postsináptica (en este caso los receptores de AMPA, kainato y NMDA), provocando la despolarización e incremento de calcio que hacen posible la transmisión del impulso nervioso. Por tanto, en términos generales, podemos afirmar que el control de la transmisión sináptica puede darse a dos niveles: regulando la liberación de neurotransmisor, a nivel presináptico, o modificando la actividad de los receptores de glutamato postsinápticos. Dada su localización en la zona activa presináptica, donde tiene lugar la liberación de neurotransmisor, los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III y, en especial mGluR7, constituyen uno de los sistemas de modulación presináptica de la neurotransmisión glutamatérgica, ya que actúan como autorreceptores que, activados por el glutamato liberado por la misma terminación sináptica en la que se encuentran, inhiben la liberación de neurotransmisor (Gereau y Conn, 1995; Vignes y cols., 1995; Herrero y cols., 1996; Millán y cols., 2002a; Ladera y cols., 2007). Función que comparten con los heterorreceptores que, activados por neurotransmisores liberados por botones sinápticos no glutamatérgicos, también reducen la liberación de neurotransmisor liberado por la presinapsis glutamatérgica, es el caso de los receptores de adenosina A<sub>1</sub> y GABA<sub>B</sub> (Bonanno y Raiteri, 1992; Barrie y Nichols, 1993; Ladera y cols., 2007 y 2008).

La liberación de glutamato es sólo la etapa final de un proceso extremadamente complejo. El glutamato se acumula en vesículas sinápticas mediante transportadores específicos. Para que el glutamato pueda ser liberado, estas vesículas tienen que llegar primero a los sitios de liberación en la zona activa, interaccionar con las proteínas de la maquinaria exocitótica, dando lugar al proceso de ensamblaje entre las proteínas de la vesícula y la membrana plasmática y preparación final necesarias para que estas vesículas queden preparadas la fusión. Exocitosis que sólo tendrá lugar cuando un aumento del calcio intracelular active los sensores de calcio. Pero para que tenga lugar este

incremento de calcio se requiere primero la llegada de un potencial de acción, como consecuencia de la actividad de los canales de sodio y de potasio presentes en la terminación, que provoque la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje. Por tanto, como moduladores de la liberación de glutamato, los receptores de glutamato del grupo III y en especial, mGluR7 (así como los heterorreptores), disponen de un amplio abanico de posibilidades de acción. Aunque ya se conocen sus acciones a distintos niveles, como es el caso de la inhibición de los canales de calcio (Millán y cols., 2002a, 2002b, 2003; Ladera y cols., 2007), la regulación de la excitabilidad neuronal mediada por canales de potasio o por la vía de adenilato ciclasa/proteína quinasa A (Millán y cols., 2002a, Ladera y cols. 2007 y 2008) o el control de la propia maquinaria exocitótica (Blackmer y cols., 2005); todavía queda mucho por estudiar. Por eso, avanzar en este sentido es el principal objetivo de esta Tesis doctoral.

## **1. Los receptores metabotrópicos como moduladores de la liberación de glutamato.**

### **1.1. Receptores metabotrópicos de glutamato.**

Durante mucho tiempo se pensó que la transmisión glutamatérgica estaba mediada únicamente por receptores ionotrópicos. Sin embargo, en 1985, Sladeczek y colaboradores demostraron la presencia, en cultivos neuronales de estriado, de receptores de glutamato insensibles a AMPA, kainato y NMDA, y que estimulaban la actividad de fosfolipasa C y la formación de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) a través de la activación de proteínas G. Poco después se observaron efectos similares en rodajas de hipocampo (Nicoletti y cols., 1986a, b), en cultivos de células granulares de cerebelo (Nicoletti y cols., 1986c) y en cultivos de astrocitos (Pearce y cols., 1986). Estos hallazgos llevaron al clonaje en 1991 del primer receptor metabotrópico de glutamato (mGluR1) (Masu y cols., 1991; Houamed y cols., 1991) y en un breve período de tiempo al del resto de los mGluRs (Tanabe y cols., 1992; Abe y cols., 1992; Nakajima y cols., 1993; Saugstad y cols., 1994, 1997; Okamoto y cols., 1994; Flor y cols., 1995; Duvoisin y cols., 1995).

Los receptores metabotrópicos de glutamato poseen los siete dominios transmembrana característicos de todos los receptores acoplados a proteínas G, pero el resto de su estructura molecular difiere lo suficiente de éstos como para considerarse que han evolucionado a partir de una familia de receptores independiente (Hollmann y Heinemann, 1994; Nakanishi, 1994), que

ha sido denominada como familia C ó 3 (Bockaert y Pin, 1999). De hecho, la homología entre las secuencias de esta familia y el resto de receptores metabotrópicos es mínima exceptuando al receptor GABA<sub>B</sub> (Couve y cols., 2000) y a ciertos receptores sensibles a Ca<sup>2+</sup> extracelular (Brown y cols., 1993; Brown y McLeod, 2001) y a feromonas (Matsunami y Buck, 1997; Herrada y Dulac, 1997). La familia de receptores metabotrópicos de glutamato es heterogénea en cuanto a su tamaño, que varía entre 854 y 1179 aminoácidos. Los dominios amino y carboxilo terminales son inusualmente largos comparados con los del resto de receptores acoplados a proteínas G. Otra de las grandes divergencias con el resto de receptores metabotrópicos es que, en los receptores de glutamato, el sitio de unión de glutamato se localiza en el dominio amino terminal y es homólogo a las proteínas de unión de aminoácidos bacterianas (Armstrong y Gouaux, 2000), a diferencia de la mayoría de las familias de receptores metabotrópicos, en las que el sitio de unión del ligando está constituido por las regiones extracelulares de varios segmentos transmembrana. Además, los receptores metabotrópicos de glutamato ejercen su acción como dímeros a diferencia de la mayoría de receptores metabotrópicos, compuestos por una subunidad individual (Kunishima y cols., 2000). Por otro lado, el tercer bucle intracelular, responsable de la unión de las proteínas G en la mayoría de receptores metabotrópicos, está relativamente reducido, por lo que el acoplamiento de los receptores metabotrópicos de glutamato a las proteínas G tiene lugar en su dominio carboxilo terminal, de mucha mayor extensión.

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) se dividen en 3 grupos en función de la homología de su secuencia de aminoácidos (70% de homología dentro del mismo grupo, 40-45% entre los diferentes grupos), su farmacología y la vía de transducción de señales que activan.

### **1.1.1. Receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I.**

El grupo I de receptores metabotrópicos de glutamato está constituido por los receptores mGlu1 y mGlu5, que a su vez presentan variantes de procesamiento alternativo denominadas 1a, 1b, 1c y 1d (Pin y cols., 1992; Mary y cols., 1997), y 5a y 5b (Joly y cols., 1995; Minakami y cols., 1995). También se ha encontrado una isoforma de mGluR1 en las papilas gustativas, que presenta un dominio amino terminal con la mitad de aminoácidos, al que se ha denominado *taste mGluR1* (Chaudhari y cols., 2000; San Gabriel y cols., 2005, 2009).

Los receptores de este grupo se localizan tanto a nivel postsináptico (Martín y cols., 1992; Baude y cols., 1993; Gorcs y cols., 1993; Nusser y cols., 1994; Hamori y cols., 1996; Luján y cols., 1996, 1997; Petralia y cols., 1996; Shigemoto y cols., 1993, 1997; Mateos y cols., 2000; López-Bendito y cols., 2002), como presináptico (Fotuhi y cols., 1993; Wittmann y cols., 2001; Hubert y cols., 2001; Paquet y Smith, 2003; Kuwajima y cols., 2004); lo que les confiere un gran potencial como reguladores de la transmisión sináptica. Por un lado, su localización en la periferia de la densidad postsináptica les permite modular la actividad de los receptores AMPA y NMDA (Fitzjohn y cols., 1996; Rahman y Neuman, 1996; Yu y cols., 1997; Ugolini y cols., 1997; Anwyl y cols., 1999; Krieger y cols., 2000; Skeberdis y cols., 2001; Pisani y cols., 2001; Lan y cols., 2001; Mannaioni y cols., 2001; Heidinger y cols., 2002; Guo y cols., 2004; Calò y cols., 2005; Stefani y Moghaddam, 2010; Rosenbrock y cols., 2010) jugando un papel esencial en el control de la excitabilidad neuronal y en los procesos de plasticidad sináptica, tanto de depresión (LTD) (Aiba y cols., 1994; Shigemoto y cols., 1994; Levenes y cols., 1998; Ichise y cols., 2001; Gubellini y cols., 2001; Wu y cols., 2004; Piccinin y cols., 2010), como de potenciación a largo plazo (LTP) (O'Connor y cols., 1995; Lu y cols., 1997; Jia y cols., 1998; Balschun y Wetzell, 2002; Rodrigues y cols., 2002; Fendt y Schmid, 2002; Lee y cols., 2002; Miura y cols., 2002; Wang y cols., 2009; Suzuki y Okada, 2010). Por otro lado, desde su situación presináptica, estos receptores también pueden regular la transmisión sináptica mediante la modulación de la liberación de glutamato, sobre la que ejercen un efecto dual (Herrero y cols., 1992b, 1994, 1998; Gereau y Conn, 1995; Manzoni y Bockaert, 1995; Rodríguez-Moreno y cols., 1998; Cochilla y Alford, 1998; Sistiaga y Sánchez-Prieto, 2000a, 2000b; Schwartz y Alford, 2000) que también está implicado en los procesos de plasticidad sináptica (Manahan-Vaughan y cols., 1999).

Atendiendo a sus mecanismos de señalización, este grupo de receptores metabotrópicos de glutamato estimula la hidrólisis de fosfoinosítidos mediante la activación de la fosfolipasa C (PLC), promoviendo la formación de diacilglicerol (DAG) e inositol-trifosfato (IP3) (Nicoletti y cols., 1986a, 1986b, 1986c; Manzoni y cols., 1990; Schoepp y cols., 1990; Houamed y cols., 1991; Masu y cols., 1991; Aramori y Nakanishi, 1992; Pin y cols., 1992; Pickering y cols., 1993; Ferraguti y cols., 1994; Hermans y cols., 1998) mediante una vía de señalización que implica la activación de proteínas G resistentes a toxina pertúsica (Pin y Duvoisin, 1995; Thomsen, 1996; Conn y Pin, 1997; Hiltscher y cols., 1998; Hartmann y cols., 2004). Esta señalización es suprimida durante una estimulación prolongada del receptor mediante su fosforilación por proteína quinasa C (Herrero y cols., 1994; Gereau y Heinemann, 1998; Kammermeier e

Ikeda, 2002; Mundell y cols., 2003) o por proteínas quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK). En este último caso, la fosforilación favorece la unión de la proteína  $\beta$ -arrestina, que desacopla al receptor de la proteína G (De Blasi y cols., 2001; Mundell y cols., 2001, 2002 y 2003). Otros efectos atribuidos a los receptores metabotrópicos del grupo I son el incremento de los niveles intracelulares de AMPc (Joly y cols., 1995; Thomsen, 1996), la activación de fosfolipasa D (Servitja y cols., 1999; Shinomura y cols., 2000), la inhibición de canales de potasio (Ikeda y cols., 1995; Kammermeier e Ikeda, 1999; Kammermeier y cols., 2000) así como la inhibición de canales de calcio dependientes de voltaje del tipo N y P/Q (Choi y Lovinger, 1996; McCool y cols., 1996, 1998; Stefani y cols., 1998; Kammermeier e Ikeda, 1999; Kammermeier y cols., 2000), la fosforilación de la proteína quinasa activada por mitógenos p38 (p38MAPK) (Wang y cols., 2007) y la activación de la proteína quinasa Jun (Li y cols., 2007).

### **1.1.2. Receptores metabotrópicos de glutamato del grupo II.**

El grupo II de receptores metabotrópicos de glutamato incluye los receptores mGlu2 y mGlu3. Aunque no se conocen distintas variantes de procesamiento alternativo de mGluR2, se han descrito recientemente cuatro isoformas correspondientes al procesamiento alternativo del ARN de mGluR3: GRM3 (contiene todos los exones) y las variantes GRM3\_2, GRM3\_4 y GRM3\_2\_3 (según hayan perdido los exones 2, 4 o 2 y 3, respectivamente) (Sartorius y cols., 2006).

Este grupo de receptores presenta una localización subcelular tanto postsináptica como presináptica (Neki y cols., 1996; Petralia y cols., 1996; Shigemoto y cols., 1997; Ohishi y cols., 1998; Meguro y cols., 1999; Tamaru y cols., 2001), situándose preferentemente en la periferia de la terminación nerviosa, lejos de la zona activa de liberación (Shigemoto y cols., 1997; Wada y cols., 1998), esto concuerda con su alta afinidad por el glutamato (Schoepp y cols., 1999) y sugiere que estos receptores podrían activarse en aquellas situaciones en las que el glutamato difunde más allá de la brecha sináptica, en procesos de estimulación de alta frecuencia, pudiendo ser activados tanto por el glutamato procedente de la sinapsis propia como de las sinapsis vecinas (Scanziani y cols., 1997; Vogt y Nicoll, 1999; Kew y cols., 2001). De este modo, la inhibición de la liberación producida por el receptor evitaría la aparición de niveles neurotóxicos de glutamato en la hendidura sináptica, manteniendo su concentración en todo momento dentro del rango fisiológico. Por otro lado,

dada su presencia en células gliales (Petrulia y cols., 1996; Mineff y Valtschanoff, 1999) podrían estar implicados en múltiples aspectos de la función glial y en la comunicación glía-neurona (Corti y cols., 2007; Durand y cols., 2010).

Los receptores metabotrópicos del grupo II están acoplados negativamente a adenilato ciclasa, inhibiendo la formación de AMPc (Manzoni y cols., 1992; Prézeau y cols., 1992, 1994; Tanabe y cols., 1993; Conn y Pin, 1997), por un mecanismo que depende de la activación de proteínas G sensibles a toxina pertúsica de tipo Gi/Go. Al igual que los receptores del grupo I, estos receptores también inhiben la actividad de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (Chavis y cols., 1995; Ikeda y cols., 1995; Choi y Lovinger, 1996; McCool y cols., 1996), siendo esta acción la responsable de los efectos depresores que estos receptores ejercen sobre muchas sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas del Sistema Nervioso Central.

### **1.1.3. Receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III. mGluR7.**

Este grupo de receptores está integrado por los subtipos mGluR4, mGluR6 mGluR7 y mGluR8. Aunque, en un principio se describieron dos variantes de procesamiento alternativo de mGluR4 (las isoformas a y b) (Thomsen y cols., 1997), la existencia de la isoforma mGluR4b fue posteriormente cuestionada (Corti y cols., 2002). Como en el caso de mGluR1, también existe una isoforma de mGluR4 con un dominio amino terminal con la mitad de aminoácidos, que se expresa en las papilas gustativas, denominada *taste mGluR4* (Chaudhari y cols. 2000). mGluR6 presenta 3 variantes de procesamiento alternativo (mGluR6 a, b y c) (Niswender y Conn, 2010) de las cuales, las dos últimas, sólo conservan su dominio amino terminal, pudiendo actuar como receptores de glutamato solubles (Valerio y cols., 2001). mGluR7, por su parte, presenta 5 isoformas diferenciadas en su extremo carboxilo terminal (Ferraguti y Shigemoto, 2006), mGluR7a (Okamoto y cols., 1994), mGluR7b (Flor y cols., 1997; Corti y cols., 1998), mGluR7c, d y e (Schulz y cols., 2002) que contienen 915, 922, 924, 911 y 906 aminoácidos, respectivamente. Del mismo modo, las isoformas mGluR8a y b también difieren en su extremo carboxilo terminal (Duvoisin y cols., 1995; Corti y cols., 1998). También se ha encontrado en el cerebro humano una isoforma de mGluR8 (mGluR8c) constituida únicamente por el dominio amino terminal (Malherbe y cols., 1999), que podría ser secretada y actuar como un receptor soluble o como un receptor dominante negativo.

### - Estructura e interacción con proteínas.

Como todos los receptores metabotrópicos de glutamato, la estructura de mGluR7 se caracteriza por presentar un largo dominio amino terminal extracelular de unos 600 aminoácidos, siete dominios transmembrana característicos de todos los receptores acoplados a proteínas G, y un dominio carboxilo terminal intracelular. El largo dominio amino terminal, denominado dominio *Venus flytrap* por su parecido figurado a una planta carnívora (fig I. 1.), (Niswender y Conn, 2010) contiene el sitio de unión del glutamato (O'Hara y cols., 1993; Tones y cols., 1995; Okamoto y cols., 1998). Según el modelo propuesto por O'Hara esta región forma dos lóbulos globulares con una zona central que actúa como bisagra, por donde se une el neurotransmisor. La unión de glutamato provoca el cierre de los lóbulos en torno al ligando, pasando el receptor de una conformación "abierta" a una conformación "cerrada". Este modelo ha sido confirmado por trabajos realizados con quimeras del receptor (Tones y cols., 1995), y por estudios de cristalografía con rayos X (Kunishima y cols., 2000; Tsuchiya y cols., 2002; Kuang y cols., 2003; Acher y cols., 2005; Muto y cols., 2007), habiéndose propuesto un modelo similar para otros receptores de la familia C, como GABA<sub>B</sub> (Gálvez y cols., 1999), y para los receptores ionotrópicos de glutamato (Stern-Bach y cols., 1994; Kuusinen y cols., 1995). Existen evidencias que indican que los dos dominios *Venus flytrap* correspondientes a las dos subunidades que forman el dímero activo del receptor, interaccionan en sus partes dorsales. Este dímero sufre importantes cambios conformacionales cuando el ligando se une a uno o a ambos dominios *Venus* (Jingami y cols., 2003). De este modo, el dímero podría presentar tres estados principales: abierto-abierto, abierto-cerrado o cerrado-cerrado. La primera de las tres conformaciones (inactiva) sería estabilizada por los antagonistas y las otras dos por la unión de uno o dos agonistas, respectivamente. Así, las mutaciones que impiden el cierre de estos dominios hacen que los antagonistas actúen como agonistas (Bessis y cols., 2002), indicando que la orientación relativa de estos dos dominios es importante para la activación del receptor. Aparte de glutamato o los agonistas ortostéricos, a estos dominios también se pueden unir cationes divalentes como Ca<sup>2+</sup> o Mg<sup>2+</sup> que favorecen la activación del receptor (Kunishima y cols., 2000; Kubo y cols., 1998; Francesconi y cols., 2004).

Los cambios conformacionales inducidos por la unión de los ligandos a los dominios *Venus* son propagados hasta los 7 segmentos transmembrana y el dominio carboxilo terminal gracias al dominio rico en cisteínas (fig. I. 1). Este dominio está formado por 9 residuos de cisteína de los

cuales, 8 de ellos están unidos por puentes disulfuro (Muto y cols., 2007). Los estudios de cristalización y mutagénesis dirigida muestran que la propagación del cambio conformacional provocado por la unión del glutamato es posible en parte por el puente disulfuro formado entre el noveno residuo de cisteína y un residuo de cisteína situado en lóbulo 2 del dominio Venus (Muto y cols., 2007; Rondard, 2006).

Los 7 dominios transmembrana se encuentran conectados por 3 bucles intracelulares y 3 extracelulares. Mediante estudios con receptores quimera se ha observado que el segundo bucle intracelular (i2) es el responsable del reconocimiento selectivo de la subunidad  $\alpha$  de la proteína G (Pin y cols., 1994; Gomeza y cols., 1996) (fig I. 1.), aunque el resto de los bucles intracelulares y el dominio C-terminal están también implicados en la eficacia del acoplamiento del receptor a la proteína (Gabellini y cols., 1993; Pin y cols., 1994; Gomeza y cols., 1996).

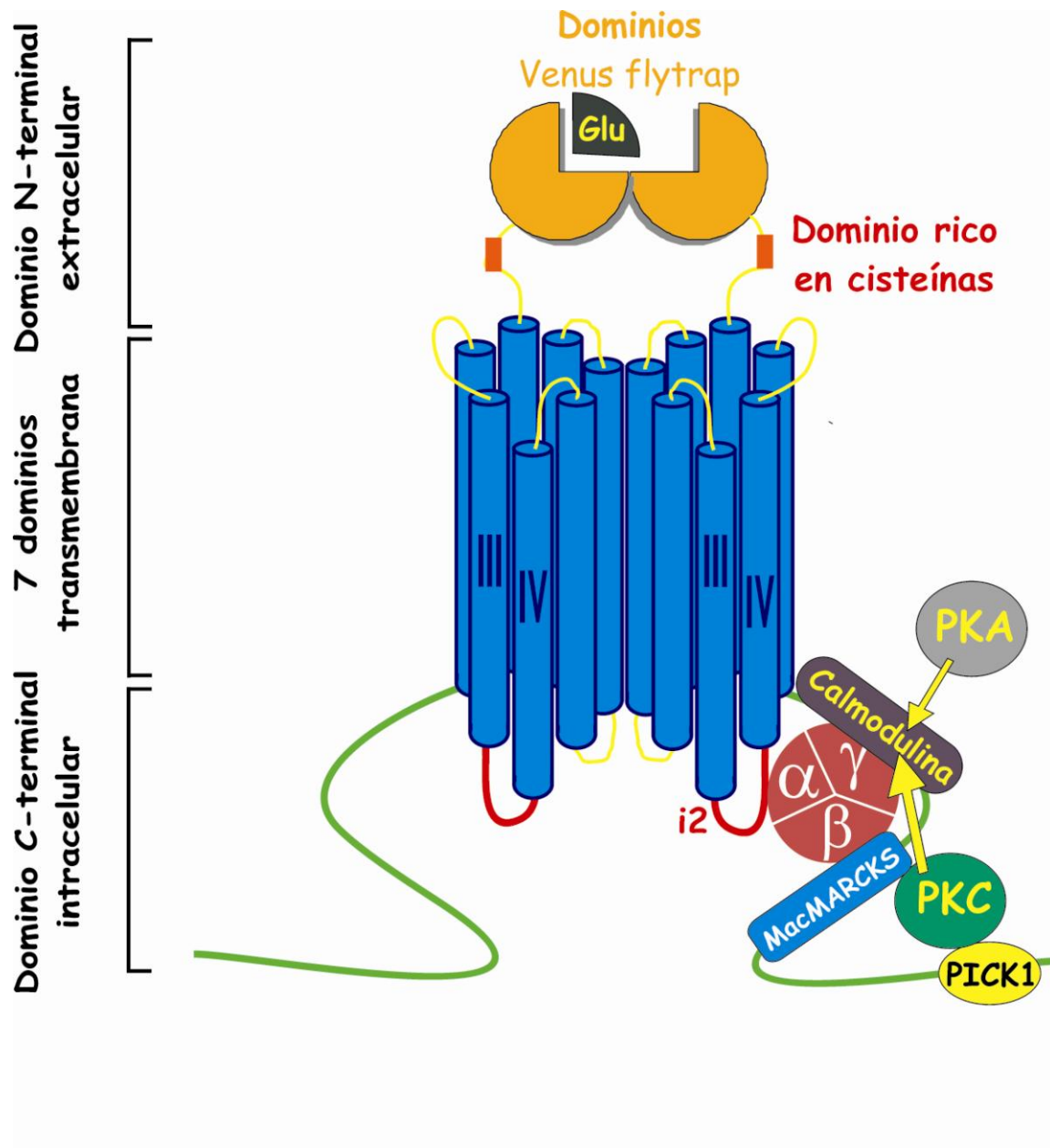
El dominio carboxilo terminal es la región que define las distintas isoformas de mGluR7 y su región central parece desempeñar un papel esencial en la localización del receptor en la terminación presináptica, ya que inserciones o eliminaciones de determinadas secuencias en esta región modifican el destino final del receptor (Stowell y Craig, 1999). Además, el extremo carboxilo terminal presenta, sitios de interacción con múltiples proteínas (Enz y Croci, 2003) que regulan la localización sináptica y la función del receptor, como son: PICK1 (proteína de interacción con quinasa C) (El Far y cols., 2000; Dev y cols., 2000, 2001; Boudin y cols., 2000, Enz y Croci, 2003), calmodulina (Minakami y cols., 1997; O'Connor y cols., 1999; Nakajima y cols., 1999), MacMARCKS (proteína de macrófagos miristoilada rica en alanina y sustrato de quinasa C) (Bertaso y cols., 2006), GRIP (proteína que interacciona con receptores de glutamato), sintenina (Hirbec y cols., 2002), proteína fosfatasa 1, filamina A (Enz y cols., 2002a, 2002b) y  $\alpha$ -tubulina (Saugstad y cols., 2002); así como sitios de fosforilación para la proteína quinasa A (PKA) (Cai y cols., 2001) y para la proteína quinasa C (PKC) (Gereau y Heinemann, 1998; Nakajima y cols., 1999; Dev y cols., 2000; Airas y cols., 2001) (Fig.I.1).

El extremo distal del dominio carboxilo terminal de mGluR7 presenta una secuencia de reconocimiento de dominios PDZ que permite al receptor la interacción con la proteína PICK 1 (fig. I. 1.). Esta interacción parece estar implicada en el agrupamiento del receptor en la zona activa (Boudin y cols., 2000) así como en la funcionalidad del mismo (Dev y cols., 2000; Perroy y cols., 2002; Zhang y cols., 2008). Además, parece que la estabilización del receptor en la membrana requiere tanto la interacción con PICK 1 como la



fosforilación por PKC (Suh y cols., 2008). De este modo, la unión de PICK 1 al receptor posibilitaría a su vez la unión de PKC y la consiguiente fosforilación del receptor (fig. I. 1). Sin embargo, estos datos no explican el hecho de que la activación de PKC conduzca a la supresión de la función del receptor y de su capacidad para inhibir canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Macek y cols., 1998, 1999; Cai y cols., 2001; Millán y cols., 2002 a).

El sitio de unión a calmodulina es especialmente relevante para la función del receptor ya que coincide con la región de unión de la subunidad  $\text{G}\beta\gamma$  de las proteínas G (Fig.I.1). Ambas proteínas compiten en su unión a  $\text{mGluR7a}$ , de modo que la calmodulina unida impide la unión de las subunidades  $\text{G}\beta\gamma$ , que quedan así disponibles para inhibir los canales de calcio y la liberación de neurotransmisores (Airas y cols., 2001) (Fig.I.1). Esto concuerda con los experimentos realizados por nuestro grupo en terminaciones nerviosas de corteza cerebral, en los que los antagonistas de calmodulina suprimen la inhibición de la liberación de glutamato mediada por  $\text{mGluR7}$  (Millán y cols., 2002a). Por otro lado, PKA y PKC regulan esta interacción al fosforilar una serina de  $\text{mGluR7}$  en la región de unión con calmodulina (Cai y cols., 2001; Airas y cols., 2001; Sorensen y cols., 2002) (fig. I.1). Parece que la proteína MacMARCKS (proteína de macrófagos miristoilada rica en alanina y sustrato de quinasa C) también está implicada en la competición entre calmodulina y subunidades  $\text{G}\beta\gamma$  por su unión a  $\text{mGluR7}$  (fig. I. 1). La unión de esta proteína al dominio C-terminal del receptor estabilizaría la unión de subunidades  $\text{G}\beta\gamma$  al receptor (Bertaso y cols., 2006).



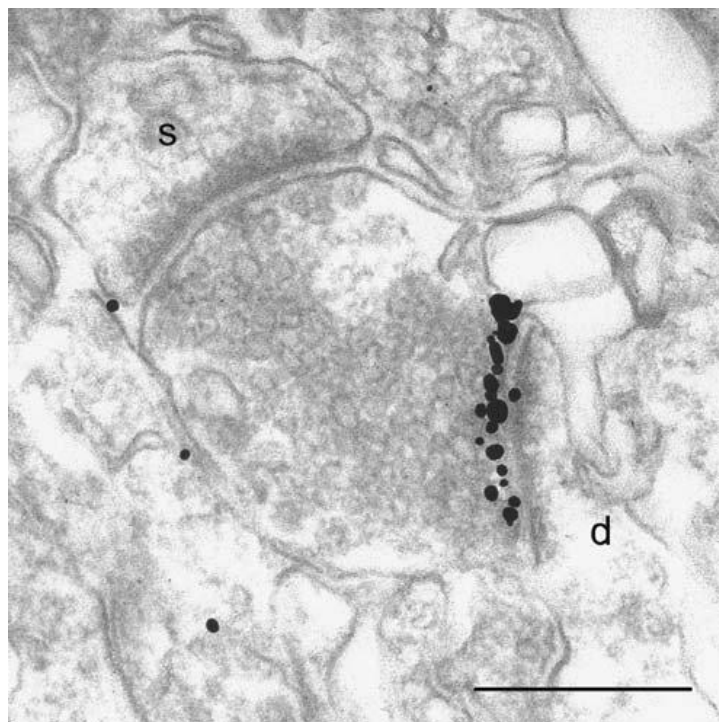
**Figura I. 1. Esquema de la estructura de mGluR7.**

El glutamato se une a cada uno de los dominios *Venus flytrap* en el extremo amino terminal. El segundo bucle intracelular (i2) es el responsable del reconocimiento selectivo de la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G. Las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas G y calmodulina comparten el sitio de unión en la región proximal del dominio carboxilo terminal. PKA y PKC forforilan una serina en este sitio, regulando la unión de calmodulina y de la proteína G. La proteína unión de proteína MacMARCKS en el extremo carboxilo terminal estabiliza la unión de las subunidades  $G\beta\gamma$ . La proteína PICK 1 se une al sitio de reconocimiento de dominios PDZ en la región distal del extremo carboxilo terminal. Parece que esta unión podría favorecer la unión de PKC y la consiguiente fosforilación del receptor. (Adaptado de Niswender y Conn, 2010).

**- Patrón de expresión y localización subcelular:**

Los receptores mGluR7a se expresan de manera abundante en el bulbo olfatorio principal, tubérculo olfatorio, corteza cerebral (neocórtex y córtex piriforme), hipocampo (incluyendo las áreas CA3-CA1 y el giro dentado), septo, estriado, núcleo accumbens, claustró, complejo amigdalóide, región preóptica, hipotálamo, tálamo, colículo superior, locus coeruleus, núcleo coclear dorsal y en el asta dorsal de la médula espinal (Bradley y cols., 1996 y 1998; Shigemoto y cols., 1997; Kinzie y cols., 1997; Phillips y cols., 1998; Kinoshita y cols., 1998; Corti y cols., 1998; Wada y cols., 1998; Kosinski y cols., 1999). La isoforma mGluR7b presenta una distribución mucho más restringida que mGluR7a (Corti y cols., 1998), de este modo, la mayoría de las regiones que contienen la mGluR7b también expresan mGluR7a (Shigemoto y cols., 1997) mientras que, por el contrario, la mayoría de las regiones del sistema nervioso central que presentan inmunorreactividad para mGluR7a no lo hacen para la isoforma mGluR7b (Shigemoto y cols., 1997). En el hipocampo, por ejemplo, mGluR7a está presente a lo largo de todas las capas dendríticas, mientras que mGluR7b sólo se observa en la zona terminal de las fibras musgosas. Atendiendo a su localización subcelular, ambas isoformas se observan exclusivamente en la zona activa presináptica (Bradley y cols., 1996 y 1998; Shigemoto y cols., 1996 y 1997; Kinzie y cols., 1997; Kinoshita y cols., 1998; Somogyi y cols., 2003). Así, se ha observado expresión de mGluR7a en las terminaciones sinápticas de las fibras aferentes primarias que acaban en las láminas I y II del asta dorsal de la médula espinal (Ohishi y cols., 1995), en los islotes de Calleja (Kinoshita y cols., 1998), en la capa I de la corteza piriforme (Kinzie y cols., 1997; Wada y cols., 1998) y en las fibras corticoestriatales y estriatonigrales de los ganglios basales (Kosinski y cols., 1999). Esta localización en la zona activa de las terminaciones sinápticas permite a los receptores mGlu7 actuar como autorreceptores que inhiben la liberación de glutamato. No obstante, también se ha descrito la presencia de mGluR7a en las terminaciones de interneuronas gabaérgicas, actuando en este caso, como heterorreceptores que inhiben la transmisión sináptica inhibitoria (Kogo y cols., 2004). En algunas localizaciones, como en el hipocampo, se ha descrito una asociación entre la presencia de un determinado receptor metabotrópico a nivel postsináptico y la expresión de mGluR7 en la presinapsis. Así, se ha observado una mayor densidad de mGluR7 en aquellas terminaciones que hacen sinapsis con dendritas de interneuronas GABAérgicas que expresan mGluR1 (Shigemoto y cols., 1996; Somogyi y cols. 2003), constituyendo éste, un ejemplo de cómo la

diana postsináptica puede influir en la localización de los receptores presinápticos (fig. I.2.).



**Figura I. 2. La diana postsináptica determina la localización de mGluR7a en la presinapsis.** Micrografía electrónica que muestra cómo el inmunomarcaje para mGluR7a se concentra en la zona activa de la terminación nerviosa que contacta con la espina dendrítica de una célula gabaérgica (d) pero no en los botones que sinapsan con la espina de una neurona piramidal (s). (Adaptada de Shigemoto y cols., 1996).

Atendiendo a los factores que dirigen la correcta localización de mGluR7 en la presinapsis, estudios con quimeras han puesto de manifiesto que ésta depende de una secuencia de 60 aminoácidos presente en la región central del dominio carboxilo-terminal del receptor (Stowell y Craig, 1999). Sin embargo, si bien la integridad de esta secuencia es fundamental para la localización del receptor en la terminación sináptica, no parece estar implicada en el agrupamiento de los receptores en la zona activa de liberación. En los mecanismos moleculares que favorecen este agrupamiento podría estar implicada la interacción de mGluR7 con algunas proteínas con dominios PDZ (*PSD 95*, *discs large*, *zonula occludens*) y, en especial con PICK1 (proteína que interacciona con quinasa C-1) (Boudin y cols., 2000; Boudin y Craig, 2001; Perroy y cols., 2002). Esta interacción se establece a través de una secuencia de

reconocimiento de PDZ presente en la región distal del extremo carboxilo terminal del receptor. La pérdida de esta secuencia no impide la presencia del receptor en la presinapsis, pero sí su concentración en la zona activa (Boudin y cols., 2000). Otras proteínas con dominios PDZ que interaccionan con mGluR7 y que podrían estar implicadas en su localización son las proteínas GRIP (proteína que interacciona con receptores de glutamato) y sintenina (Hirbec y cols., 2002). También se ha observado que el dominio carboxilo terminal de mGluR7b es capaz de unirse a  $\alpha$ -tubulina (Saugstad y cols., 2002) o a la subunidad catalítica  $\gamma$  de la proteína fosfatasa 1, así como a la proteína de unión a actina, filamina A (Enz y cols., 2002 a y b). Esta última forma parte de la familia de proteínas de unión a actina  $\alpha$ -actinina/espectrina/distrofina, capaces de inducir la polimerización de filamentos de actina y la formación de la malla adyacente a la membrana plasmática (Hartwig y Kwiatkowski, 1991). De este modo, la interacción mGluR7b-filamina A podría participar en la correcta localización de mGluR7 dentro del complejo proteico de la zona activa.

La distribución de los receptores de los tipos mGluR4 y mGluR8 es más restringida que la de mGluR7. mGluR4 se expresa principalmente en cerebelo, siendo especialmente abundante en los terminales de las fibras paralelas (axones de las células granulares) (Kinoshita y cols., 1996; Mateos y cols., 1998, 1999; Corti y cols., 2002). En hipocampo se ha encontrado una expresión elevada en la capa molecular del giro dentado, en el estrato molecular de CA1 y en el estrato oriens (Bradley y cols., 1996; Corti y cols., 2002). También aparece de forma abundante en los ganglios basales (Bradley y cols., 1999; Corti y cols., 2002), tálamo (Corti y cols., 2002) y en el córtex piriforme (Benítez y cols., 2000), siendo su expresión más reducida en corteza (Ohishi y cols., 1995; Corti y cols., 2002). Atendiendo a los cambios ligados al desarrollo, nuestro grupo ha observado diferencias en la expresión de mGluR4 en las terminaciones nerviosas de la corteza cerebral de ratas jóvenes (21 días) y adultas (2 meses). Así, mientras que en las primeras mGluR4 se expresa en una cuarta parte de las terminaciones nerviosas, en las ratas adultas esta expresión prácticamente desaparece, coincidiendo con una pérdida de la inhibición de la liberación mediada por este receptor (Millán y cols., 2002b). Por otro lado, recientemente se ha descrito la interacción de mGluR4 con la proteína asociada a microtúbulos 1 B (MAP1B), interacción que podría estar implicada en la correcta localización de este receptor en la zona activa. (Moritz y cols., 2009).

La expresión de mGluR8 se ha descrito en la capa 1a del córtex piriforme (Kinoshita y cols., 1996; Wada y cols., 1998), localizándose en los terminales del tracto olfatorio lateral, procedentes del bulbo olfatorio, donde el

ARNm para mGluR8 muestra una expresión muy elevada (Duvoisin y cols., 1995; Saugstad y cols., 1997). La presencia de este receptor también ha sido descrita en hipocampo (vía perforante lateral) (Shigemoto y cols., 1997), en médula espinal (Thomas y cols., 2001), y, de manera más restringida, en corteza cerebral y cerebelo (Saugstad y cols., 1997). La localización subcelular de estos dos receptores es fundamentalmente presináptica (Kinoshita y cols., 1996; Shigemoto y cols., 1997; Benítez y cols., 2000; Corti y cols., 2002). Al igual que mGluR7, pueden actuar como autorreceptores, inhibiendo la liberación de glutamato o como heterorreceptores, modulando a nivel presináptico la liberación de otros neurotransmisores, especialmente GABA (Snead y cols., 2000; Semyanov y Kullman, 2000; Wittmann y cols., 2001; Corti y cols., 2002; Ferraguti y cols., 2005).

mGluR6 se expresa exclusivamente en las células bipolares ON de la retina (Nakajima y cols., 1993; Akazawa y cols., 1994; Vardi y cols., 1997, 2000), donde su localización es somatodendrítica, interviniendo en la modulación de la transmisión sináptica entre fotorreceptores y células bipolares (Masu y cols., 1995).

### **- Farmacología:**

La mayoría de los agonistas ortostéricos (aquellos que se unen al mismo lugar que el ligando endógeno) y antagonistas de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III se obtienen por modificaciones de su agonista endógeno, el ácido L-glutámico. El ácido L-2-amino-4-fosfonobutírico (L-AP4), el O-fosfato de L-serina (L-SOP) (Acher y cols., 1997) y la fosfonofenilglicina (PPG) (Gasparini y cols., 1999) son agonistas selectivos ampliamente utilizados. L-AP4 es el agonista ortostérico por excelencia de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III ya que tiene un efecto altamente selectivo sobre este grupo de receptores respecto a los otros grupos de receptores metabotrópicos de glutamato o a los receptores ionotrópicos (Schoepp y cols., 1999). La dicarboxifenilglicina [(S)-3,4-DCPG] es un agonista 100 veces más selectivo para mGluR8 que para mGluR4 (Thomas y cols., 2001; Zhai y cols., 2002).

Entre los antagonistas ortostéricos más selectivos de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III están el ácido (S)-2-Amino-2-metil-4-fosfonobutanoico (MAP4), la  $\alpha$ -metil-fosfonofenilglicina (MPPG) y la (RS)- $\alpha$ -ciclopropil-4-fosfonofenilglicina (CPPG) (Schoepp y cols., 1999). Sin embargo, presentan una baja potencia, por lo que deben usarse concentraciones

relativamente altas (Niswender y cols., 2008). La (RS)- $\alpha$ -metil-4-carboxifenilglicina (MCPG) y el ácido aminoindan-1,5-dicarboxílico (AIDA) también se comportan como antagonistas de estos receptores, pero con una potencia mucho menor (Conn y Pin, 1997; Cartmell y Schoepp, 2000).

El rasgo farmacológico más característico de mGluR7 es su baja afinidad por sus agonistas ortostéricos y por el agonista endógeno glutamato, con valores de EC50 entre 100 y 1000 veces mayor para L-AP4 y L-SOP que el resto de los receptores del grupo III (Okamoto y cols., 1994; Saugstad y cols., 1994; Conn y Pin, 1997; Schoepp y cols., 1999; Cartmell y Schoepp, 2000). Esta diferencia en la afinidad de los distintos receptores del grupo III por sus agonistas podría obedecer a pequeñas diferencias en la estructura primaria. La carga positiva de la lisina 71 de mGluR8 y mGluR4 favorece la unión de L-AP4 y L-SOP mediante uniones electrostáticas con la carga negativa del grupo fosfono, mientras que estas uniones son más débiles en el caso del receptor mGlu7, que no contiene este aminoácido (Rosemond, y cols., 2004).

Se ha descrito la capacidad de la N, N'-Bis(difenilmetil)-1,2-etanodiamina (AMN082) para actuar como agonista alostérico específico de mGluR7 (Mitsukawa y cols., 2005). Aunque este compuesto se está usando actualmente como agonista putativo de mGluR7 en ensayos *in vivo* debido a que puede ser administrado de forma oral, algunos estudios sugieren que la actividad de este compuesto es compleja. Por ejemplo, a diferencia de el L-AP4, el AMN082 no es capaz de inducir la activación de proteínas G por receptores mGlu7 expresados en líneas celulares (Suzuki y cols., 2007), ni tampoco la activación de canales rectificadores de la corriente de potasio (GIRK) mediada por mGluR7 en células de riñón embrionario humano (HEK) o la activación de los receptores mGlu7 en la sinapsis colateral de Shaffer-CA1 (Ayala y cols., 2008). Por tanto, la efectividad del AMN082 puede que se restrinja sólo a algunas vías de señalización acopladas al receptor.

También existe cierta controversia acerca de la efectividad del modulador alostérico negativo específico de mGluR7, hidrocloreuro de 6-(4-Metoxifenil)-5-metil-3-(4-piridinil)-isoxazol[4,5-c]piridin-4(5H)-1 (MMPiP). Si bien se ha comprobado que es capaz de bloquear la activación de proteínas G mediada por L-AP4 en líneas celulares que expresan mGluR7 (Suzuki y cols., 2007; Niswender y cols., 2008), por el contrario, parece que no antagoniza de manera efectiva la inhibición de adenilato ciclasa, la activación de canales de potasio GIRK ni la inhibición de la transmisión sináptica inducidas por L-AP4 (Niswender y cols., 2008).

### **- Mecanismos de señalización:**

Los receptores metabotrópicos del grupo III se caracterizan porque están acoplados negativamente a la adenilato ciclasa (Kaupmann y cols., 1997) y porque inhiben los canales de calcio dependientes de voltaje (Perroy y cols., 2000; Kammermeier e Ikeda, 2002; Millán y cols., 2002 a, 2002b, 2003; Ladera y cols., 2007), en preparaciones cerebrales, aunque también se ha observado su capacidad para modular los canales de potasio del tipo GIRK en sistemas de expresión heteróloga (O'Connor y cols., 1999). En general, estas acciones parecen mediadas por la activación de las proteínas G del tipo Gi/o, ya que la toxina pertúsica (PTx) suprime dichos efectos.

La proteína calmodulina presenta un papel relevante en el inicio de la señalización por el receptor mGluR7. Calmodulina y las subunidades G $\beta\gamma$  se unen en la misma región del extremo carboxilo terminal de mGluR7 (Dev y cols., 2001). La calmodulina unida al receptor impide la unión de la subunidad G $\beta\gamma$ , favoreciendo que la proteína G inicie la señalización e inhiba los canales de calcio (Airas y cols., 2001). De acuerdo con esta propuesta los antagonistas de calmodulina impiden la inhibición de la liberación de mGluR7 en sinaptosomas (Millán y cols., 2002a) y en cultivos neuronales (O'Connor y cols., 1999). Como ya se ha comentado, parece que la proteína MacMARCKS (proteína de macrófagos miristoilada rica en alanina y sustrato de quinasa C) también está implicada en la competición entre calmodulina y subunidades G $\beta\gamma$  por su unión a mGluR7. La unión de esta proteína al dominio C-terminal del receptor estabilizaría la unión de subunidades G $\beta\gamma$  al receptor, que actuaría como un sumidero de subunidades G $\beta\gamma$  en ausencia de estímulo. Sin embargo, la llegada de un estímulo incrementaría los niveles intracelulares de calcio, provocando la activación de calmodulina que desplazaría a la proteína MacMARKS y a las subunidades G $\beta\gamma$ , posibilitando así la inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje (Bertaso y cols., 2006).

Los receptores metabotrópicos del grupo III inhiben la enzima adenilato ciclasa, reduciendo la formación de AMPc, tanto en sistemas de expresión heteróloga (Tanabe y cols., 1993; Okamoto y cols., 1994; Saugstad y cols., 1994; Duvoisin y cols., 1995; Wu y cols., 1998a) como en preparaciones neuronales (Schoepp y Jonhson, 1993; Herrero y cols., 1996; Schaffhauser y cols., 1997; Millán y cols., 2002a). No obstante, se desconoce si esta señalización es relevante en la inhibición de la liberación de neurotransmisor. De hecho, mGluR7 inhibe la liberación de glutamato inducida por despolarización sin cambios aparentes en la concentración de AMPc (Millán y cols., 2002a). Sin embargo, hay que señalar que mGluR7 disminuye los niveles intracelulares de



AMPC cuando existe una estimulación previa de la adenilato ciclasa con forskolina o por receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Millán y cols., 2002a) lo que lleva a pensar que esta acción del receptor podría reducir o contrarrestar la facilitación de la liberación mediada por la vía AMPc/PKA.

Los mGluR del grupo III, y en concreto mGluR7, reducen la actividad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje de los tipos N y P/Q por un mecanismo delimitado de membrana mediado por las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas Gi/o. Ésta es una de las acciones responsables de la inhibición de la liberación de glutamato inducida por despolarización (Sahara y Westbrook, 1993; Hay y Kunze, 1994; Tyler y Lovinger 1995; Glaum y Miller, 1995; Takahashi y cols., 1996; Herrero y cols., 1996; Vázquez y Sánchez-Prieto 1997; Stefani y cols., 1996, 1998; Perroy y cols., 2000, Millán y cols., 2002a, Capogna, 2004). No obstante, mGluR7 también activa los canales del tipo GIRK en sistemas de expresión heteróloga por un mecanismo que depende de la calmodulina (O'Connor y cols., 1999) aunque se desconoce la repercusión funcional de este mecanismo de señalización en preparaciones cerebrales.

También se ha descrito la modulación por mGluR7 de los canales de calcio del tipo P/Q por una vía de señalización, atípica para estos receptores, que implica la activación de PLC y PKC (Perroy y cols., 2000). Esta señalización, descrita por primera vez a nivel somatodendrítico en células granulares de cerebelo transfectadas con mGluR7, se ha detectado también en rodajas de hipocampo. Así, la depresión duradera de la transmisión sináptica (LTD) producida por estimulación a alta frecuencia en las sinapsis de las fibras musgosas en la región CA3 del hipocampo se atribuye a la inhibición de la liberación de glutamato mediada por mGluR7 por un mecanismo sensible a inhibidores de PKC (Pelkey y cols., 2005).

En cultivos de neuronas de hipocampo se ha observado que mGluR7 se internaliza tras una exposición larga a agonista (Pelkey y cols., 2007). Este proceso esta mediado por un mecanismo sensible a los inhibidores de PKC (Pelkey y cols., 2005). La pérdida de la inhibición de la liberación por internalización de mGluR7 podría ser determinante en la plasticidad sináptica (Pelkey y cols., 2005). Así, la depresión de la transmisión sináptica (LTD) observada tras una estimulación de alta frecuencia de las sinapsis de las fibras musgosas con interneuronas del *stratum lucidum*, parece ser debida a una inhibición sostenida de la liberación por dicho receptor. Sin embargo, la exposición prolongada a L-AP4 parece inducir la internalización de mGluR7 y la consiguiente pérdida de inhibición presináptica, provocando que, estas mismas sinapsis, expresen LTP en respuesta a la misma estimulación de alta frecuencia, (Pelkey y cols., 2005). No obstante, parece que el paso de LTD a LTP

observado en estas sinapsis no se debe únicamente a una pérdida de inhibición presináptica de los canales de calcio de tipo P/Q mediada por mGluR7, sino que requiere la activación de la vía adenilato ciclasa/proteína quinasa A, así como y la acción de la proteína de interacción con Rab3A (RIM1 $\alpha$ ) (Pelkey y cols., 2008). De este modo, cuando el receptor está presente en la membrana mantiene secuestrada a la proteína RIM1 $\alpha$  y, por tanto, la activación de la vía adenilato ciclasa/PKA mediante la estimulación de alta frecuencia sería incapaz de inducir LTP, sin embargo, la internalización del receptor liberaría a la proteína RIM1 $\alpha$  y, por consiguiente, la activación de la vía adenilato ciclasa/PKA sí sería ahora capaz de inducir LTP (Pelkey y cols., 2008).

La repuesta inhibitoria de la liberación de los receptores metabotrópicos de glutamato es anulada por proteína quinasas como PKC (Macek y cols., 1998; Nakajima y cols., 1999; Dev y cols., 2000; Airas y cols., 2001; Millán y cols., 2002 a), y PKA (Cai y cols., 2001). Un mecanismo propuesto para esta acción es la fosforilación del extremo carboxilo terminal de mGluR7, que podría impedir la unión de la calmodulina al receptor, de manera que éste actuaría como un sumidero de subunidades G $\beta\gamma$ , que permanecerían unidas al receptor y, por tanto, no estarían disponibles para inhibir los canales de Ca<sup>2+</sup> acoplados a la exocitosis de glutamato (Macek y cols., 1998, 1999; Airas y cols., 2001; Cai y cols., 2001). Las proteína quinasas también fosforilan los canales de Ca<sup>2+</sup> acoplados a la exocitosis, lo que impide la unión de las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas G, y por tanto la expresión de la acción inhibitoria del receptor (Swartz y cols., 1993; Zamponi y cols., 1997; Hamid y cols., 1999).

Los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III también son capaces de activar las proteínas MAPK (quinasa de la proteína activada por mitógenos) y PI3K (fosfatidil inositol 3 quinasa) (Iacovelli y cols., 2002).

### **- Relevancia fisiológica:**

El receptor mGluR7 se localiza en la zona activa presináptica (Shigemoto y cols., 1996, 1997; Kinoshita y cols., 1998). Dado que este receptor presenta una baja afinidad por el glutamato, es probable que permanezca inactivo en condiciones basales, activándose únicamente tras una estimulación de alta frecuencia en la que es esperable que se alcancen concentraciones de glutamato más elevadas en la hendidura sináptica (Pelkey y cols., 2005). El control negativo ejercido por estos receptores sobre la liberación de glutamato podría contribuir a mantener la concentración del neurotransmisor en la hendidura sináptica dentro de los límites fisiológicos, evitando que alcance

niveles que podrían resultar neurotóxicos. Este hecho, unido a la capacidad de estos receptores para activar la vía de las proteínas MAPK (quinasa de la proteína activada por mitógenos) y PI3K (fosfatidil inositol 3 quinasa) (Iacovelli y cols., 2002), con efectos neuroprotectores en cultivos de células granulares de cerebelo (D'Mello y cols., 1997; Melchiorri y cols., 2001), confiere a este grupo de receptores un papel importante en los procesos de neuroprotección así como en el desarrollo de futuras aplicaciones terapéuticas frente a procesos agudos y crónicos de neurotoxicidad mediados por glutamato (Bruno y cols., 1996; Maiese y cols., 1996; Conn y Pin, 1997; Lafon-Cazal y cols., 1999; Pizzi y cols., 2000). Sirva de ejemplo la reducción de la sintomatología característica de la enfermedad de Parkinson tras el tratamiento con agonistas de los receptores de glutamato de grupo III que se observan en modelos de esta enfermedad en ratas (Lopez y cols., 2007).

La epilepsia es un desequilibrio entre la transmisión sináptica excitadora y la inhibidora a favor de la primera, que cursa con un aumento de los niveles de glutamato sináptico (Bradford, 1995; Chapman, 1998; Scheyer, 1998; Moldrich y cols., 2003). Algunos estudios han relacionado la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III con esta patología. De hecho, los ratones carentes de mGluR7 muestran una mayor predisposición a desarrollar crisis epilépticas en la edad adulta (a partir de las 12 semanas) (Sansig y cols., 2001). En este sentido, la interacción del receptor con la proteína PICK1 parece representar un papel importante. De este modo, los ratones a los que se ha inyectado un péptido permeable que impide específicamente la interacción de mGluR7 con PICK1 presentan un tipo particular de epilepsia caracterizado por crisis de ausencia (Bertaso y cols., 2008). Observándose un fenotipo similar en los ratones que carecen de la proteína PICK1 y en los que presentan una mutación en el dominio de unión de mGluR7 con PICK1. Dichos ratones también presentan una mayor susceptibilidad a los efectos de proconvulsivante pentilentetrazol (Bertaso y cols., 2008; Zhang y cols., 2008). Esto estaría de acuerdo con una posible acción anticonvulsivante de los agonistas de los receptores metabotrópicos del grupo III (Tang y cols., 1997; Chapman y cols., 1999, 2001; Gasparini y cols., 1999; Yip y cols., 2001; Folbergrova y cols., 2001; De Sarro y cols., 2002). Curiosamente, esta predisposición a la epilepsia no aparece en ratones jóvenes, donde la ausencia de mGluR7 podría compensarse con la presencia del receptor mGluR4, que controla la liberación de glutamato en los terminales sinápticos de los animales jóvenes (Millán y cols., 2003).

Los receptores metabotrópicos de glutamato desempeñan un papel esencial en los procesos cognitivos, como son la consolidación de la memoria y

del aprendizaje cerebrales (Riedel y cols., 2003). La implicación de mGluR7 en el fenómeno de metaplasticidad (cambio de LTD a LTP) de algunas sinapsis de hipocampo (Pelkey y cols., 2005) concuerda con los estudios realizados con ratones carentes de mGluR7. Estos ratones presentan alteraciones de la plasticidad sináptica a nivel del hipocampo, y de la amígdala, que afectan principalmente a la memoria a corto plazo (memoria de trabajo) [proceso en el que estaría también implicada la interacción con PICK1 (Zhang y cols., 2008)] y a la extinción de la conducta aversiva (Hölscher y cols., 2004, 2005; Callaerts-Vegh y cols., 2006; Fendt y cols., 2008; Goddyn y cols., 2008). Además, recientemente, mediante el análisis de los polimorfismos de nucleótido individual (SNPs), tres estudios independientes han confirmado la relación entre la esquizofrenia y el gen de mGluR7 (GRM7) (Ohtsuki y cols., 2008; Ganda y cols., 2009; Shibata y cols., 2009; O'Connor y cols., 2010).

## **1.2. Heterreceptores.**

### **1.2.1. Receptor GABA<sub>B</sub>.**

#### **- Estructura:**

El receptor GABA<sub>B</sub> es un heterodímero de las subunidades GABA<sub>B</sub>R1 (R1) y GABA<sub>B</sub>R2 (R2), y ambas subunidades son estrictamente necesarias para la formación de un receptor funcional (White y cols., 1998; Jones y cols., 1998; Kuner y cols., 1999). La subunidad R1 presenta en su extremo amino terminal el sitio de unión a agonistas y antagonistas (Galvez y cols., 1999), mientras que la subunidad R2 es necesaria para el reconocimiento y activación de la proteína G que inicia la señalización (Uezono y cols., 2006; Tu y cols., 2007). La subunidad R2 parece también necesaria para la distribución del receptor en la membrana plasmática, ya que permite el transporte de subunidad R1 desde el retículo endoplásmico a dicha membrana plasmática (White y cols., 1998; Couve y cols., 1998).

Existen dos isoformas de la subunidad R1 que contribuyen a su diversidad molecular, GABA<sub>B</sub>R1a y GABA<sub>B</sub>R1b (Kaupmann y cols., 1997). En estudios realizados en sistemas de expresión heteróloga como los ovocitos de *Xenopus Laevis*, se han detectado propiedades funcionales y farmacológicas diferentes para cada isoforma, de manera que la isoforma R1a podría dar lugar a receptores sensibles a gabapentina, que activan los canales GIRK (Ng y cols., 2001; Parker y cols., 2004). Estructuralmente, las dos isoformas de la subunidad

GABA<sub>B</sub>R1 se diferencian en el dominio extracelular amino terminal. De hecho, la subunidad R1a presenta dos regiones *sushi* (Blein y cols., 2004), que interaccionan con una gran variedad de proteínas implicadas en procesos de adhesión celular (Lehtinen y cols., 2004). Se ha demostrado recientemente que estos dominios *sushi* definen la localización axonal del receptor (Biermann y cols., 2010).

### **-Patrón de expresión y localización subcelular:**

Las subunidades GABA<sub>B</sub>R1 y GABA<sub>B</sub>R2 presentan una distribución amplia y heterogénea en todo el SNC de los mamíferos, donde ambas subunidades co-localizan tanto presináptica como postsinápticamente (Kulik y cols., 2003, 2006, Lopez-Bendito y cols., 2004; Lacey y cols., 2005; Luján y Shigemoto 2006, Vigot y cols., 2006). Los sitios donde se ha encontrado una mayor densidad de receptores GABA<sub>B</sub> son los núcleos del tálamo, la capa molecular del cerebelo, siendo especialmente abundante en las dendritas de las células de Purkinje, la corteza cerebral, el núcleo interpeduncular y el asta dorsal de la médula espinal (Bowery y cols., 1987; Chu y cols., 1990; Martinelli y cols., 1992; Turgeon y Albin, 1993; Maitre, 1997). Además, también es abundante en otras regiones cerebrales como el hipocampo, la amígdala, el cáliz de Held y en las neuronas de la raíz de los ganglios dorsales. (Davies y cols., 1991, Morishita y Sastry, 1994; Takahashi y cols., 1998; Poncer y cols., 2000; López-Bendito y cols., 2004; McDonald y cols., 2004; Towers y cols., 2004).

En cuanto a la localización subcelular del receptor GABA<sub>B</sub>. Este receptor se encuentra tanto a nivel presináptico como postsináptico. En el primer caso, el receptor se localiza tanto en la parte extrasináptica como en la zona activa de los terminales glutamatérgicos y gabaérgicos (Kulik y cols., 2003) aunque en estos últimos es menos abundante. A nivel postsináptico, el receptor de GABA<sub>B</sub> se localiza en la membrana extrasináptica de las espinas dendríticas junto a sus efectores, los canales de potasio rectificadores de entrada modulados por proteínas G (GIRK) (Drake y cols., 1997; Kulik y cols., 2003, 2006).

### **-Farmacología:**

El receptor GABAB fue definido por primera vez en función de sus propiedades farmacológicas (Bowery y cols., 1980) ya que respondía estereoespecíficamente al ácido (R)-4-amino-3-(4-clorofenil)butanoico (baclofén). Baclofén es un derivado del ligando endógeno del receptor, el ácido g-aminobutírico (GABA) y es, posiblemente, el agonista del receptor GABA<sub>B</sub> más conocido y más ampliamente utilizado.

Entre los agonistas del receptor GABA<sub>B</sub> destacan también los derivados del ácido fosfínico, como el ácido 3-amino propilfosfínico (3-APPA ó CGP 27492) y el ácido 3-aminopropil-metilfosfínico (3-APMPA ó CGP 35024) (Froestl y cols., 1993) que son incluso más potentes que el enantiómero activo de baclofén. Otros agonistas ampliamente utilizados son CGP 44532 y CGP 44533, que difieren poco en su afinidad por el receptor (Ong y cols., 2001). Además, se han descrito agonistas parciales del receptor GABA<sub>B</sub>, como el ácido difluorometilfosfínico o CGP 47656 (Froestl y cols., 1995).

No todos los compuestos derivados del ácido fosfínico se comportan como agonistas de este receptor. Los derivados fosfínicos de baclofén, phaclofén (Kerr y cols., 1987), saclofén e hidroxisaclofén (Kerr y cols., 1988) son antagonistas del receptor GABA<sub>B</sub> que, a pesar de su baja eficacia, han permitido realizar numerosos estudios de neuroquímica y neurofisiología. Seguidamente se sintetizaron compuestos como el CGP35341 (Froestl y Mickel, 1997), CGP 36742, (Olpe y cols., 1990) CGP 51176 (Froestl y cols., 1995) que aunque son poco eficaces, tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Finalmente, se consiguieron los antagonistas de mayor eficacia, como el CGP 54626, el CGP 55845, el CGP 56999 (Froestl y cols., 1996; Froestl y Mickel, 1997) y el CGP 46381.

### **-Mecanismos de señalización:**

El receptor GABA<sub>B</sub> está acoplado a distintos sistemas efectores que producen la hiperpolarización de las membranas postsinápticas (Newberry y Nicoll, 1984; Gähwiler y Brown, 1985; Sodickson y Bean, 1998; Tamas y cols., 2003) y que reducen la liberación de neurotransmisores tanto excitadores como inhibidores. Las acciones presinápticas incluyen la inhibición directa de los canales de calcio (Tareilus y cols., 1994; Hirata y cols., 1995; Takahashi y cols., 1998; Perikinton y cols., 1998; Ladera y cols., 2007 y 2008) y la modulación de la maquinaria exocitótica (Scanziani y cols., 1992; Dittman y Regehr, 1996; Sakaba y Neher, 2003). Además, el receptor GABA<sub>B</sub> inhibe a la adenilato ciclasa y reduce, por tanto, los niveles de AMPc intracelulares.

El receptor GABA<sub>B</sub> se acopla a proteínas G sensibles e insensibles a la toxina pertúsica (PTx). Así, mientras la inhibición presináptica de la transmisión inhibitoria y la modulación postsináptica se suprimen en presencia de PTx (Thompson y Gähwiler, 1992; Potier y Dutar, 1993), la modulación presináptica de la transmisión excitadora en el hipocampo parece resistente a esta toxina (Dutar y Nicoll, 1988; Thompson y Gähwiler, 1992).

A nivel postsináptico, el receptor GABA<sub>B</sub> produce un potencial inhibitorio lento por un mecanismo limitado de membrana debido a la activación de los canales del tipo GIRK (canales rectificadores del potencial de membrana modulados por proteínas G) (Newberry y Nicoll, 1984; Gähwiler y Brown, 1985; Sodickson y Bean, 1998; Tamas y cols., 2003), tanto en el hipocampo, como en la sustancia negra (Slesinger y cols., 1997; Otmakhova y Lisman, 2003; Koyrakh y cols., 2005). Este mecanismo de acción está de acuerdo tanto con la localización postsináptica tanto de las subunidades GIRK1 y GIRK2 de los canales de potasio (Ponce y cols., 1996; Lüscher y cols., 1997; Takigawa y Alzheimer, 1999; Chen y Johnston, 2005) como del receptor GABA<sub>B</sub> (Drake y cols., 1997; Kulik y cols., 2003, 2006) en diversas áreas cerebrales.

A nivel presináptico, los receptores GABA<sub>B</sub> modulan la transmisión sináptica mediante la inhibición directa de los canales de calcio dependientes de voltaje (Wu y Saggau, 1995a, 1995b; Hirata y cols., 1995; Dittman y Regehr, 1996; Isaacson y Hille, 1997; Ishikawa y cols., 2005; Moldavan y cols., 2006; Ladera y cols., 2007 y 2008), de acuerdo con su capacidad para inhibir la corriente presináptica de calcio (Tarelius y cols., 1994; Hirata y cols., 1995; Takahashi y cols., 1998; Perikinton y cols., 1998). Mediante el empleo de toxinas específicas se ha determinado que estos receptores modulan tanto canales de calcio del tipo N como del tipo P/Q en distintas preparaciones neuronales (Chen y van den Pol, 1998; Dittman y Regehr, 1996; Poncer y cols., 2000; Moldavan y cols., 2006; Castro y cols., 2007; Ladera y cols., 2007 y 2008). Ahora bien, el hecho de que las toxinas de los canales de calcio ocluyan las respuestas del receptor GABA<sub>B</sub> no implica necesariamente una acción directa del receptor sobre los canales de calcio. Así, la hiperpolarización asociada a la activación de los canales del tipo GIRK podría tener consecuencias para la liberación de los neurotransmisores, reduciendo la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje y en consecuencia la entrada de calcio (Sabatini y Regehr, 1997; Qian y Saggau, 1999). Por tanto, es necesario distinguir entre la modulación directa de los canales de calcio y la modulación de los canales de potasio para entender el mecanismo de señalización del receptor. Por ejemplo, en las terminaciones sinápticas de la corteza cerebral de rata adulta, donde los canales de calcio de tipo N y P/Q están segregados en terminaciones sinápticas distintas (Millán y cols., 2003), el receptor GABA<sub>B</sub> inhibe la actividad de estos dos tipos canales de calcio de forma distinta. Así, en las terminaciones sinápticas que contienen canales de calcio de tipo N, el receptor reduce la liberación de glutamato y la entrada de calcio inducidas por despolarización mediante una inhibición directa de los canales de calcio (Ladera y cols., 2007 y 2008); sin embargo, en aquellas terminaciones sinápticas con canales de calcio

de tipo P/Q, el receptor GABA<sub>B</sub> reduce la liberación de glutamato y la entrada de calcio mediante la activación de los canales GIRK (Ladera y cols., 2008). Esto coincide con el hecho de que en los ratones carentes de canales del tipo GIRK3 se haya detectado un incremento significativo en la expresión de los receptores GABA<sub>B</sub> presinápticos, sugiriendo una posible interacción funcional entre las dos proteínas (Luján y cols., 2005).

En cultivos celulares y en rodajas de cerebro, los agonistas del receptor GABA<sub>B</sub> inhiben la adenilato ciclasa previamente activada con forskolina, disminuyendo así los niveles de AMPc intracelulares (Xu y Wojcik, 1986; Knight y Bowery, 1996). En este sentido, en las terminaciones sinápticas de la corteza cerebral, el receptor GABA<sub>B</sub> reduce la liberación de glutamato inducida por la activación de la vía adenilato ciclasa/PKA con forskolina (Ladera y cols., 2007).

### **-Relevancia fisiológica:**

El receptor GABA<sub>B</sub> se localiza en la zona activa de los botones sinápticos y en los elementos postsinápticos (Drake y cols., 1997; Kulik y cols., 2003 y 2006), donde controla la transmisión sináptica excitadora e inhibitoria, tanto a nivel central como periférico.

Las acciones moduladoras que ejerce el receptor GABA<sub>B</sub> sobre la transmisión sináptica, explican su participación en los procesos de plasticidad sináptica implicados en la memoria y aprendizaje cerebrales. En este sentido, la activación del receptor GABA<sub>B</sub> está asociada a cambios duraderos de la eficacia sináptica. Este control sobre la plasticidad sináptica depende de la localización del receptor en la neurona, de manera que los receptores postsinápticos reducen la LTP debido, tanto a la hiperpolarización que producen (Davies y cols., 1991), como a la reducción de la actividad de los canales de calcio dendríticos (Pérez-García y cols., 2006). Por otro lado, los autorreceptores GABA<sub>B</sub> podrían favorecer la inducción de la LTP debido a la reducción de la inhibición de la neurona postsináptica (Davies y Collingridge, 1996). Además, el receptor GABA<sub>B</sub> parece estar implicado en el aprendizaje de los comportamientos defensivos en la amígdala; de este modo, la diferente localización de receptores GABA<sub>B</sub> respecto a la zona activa que presentan las neuronas principales y las interneuronas de la amígdala, hace que las primeras sean más susceptibles a la acción inhibitoria del GABA liberado en las sinapsis vecinas (Pan y cols., 2009).

Por otro lado, como ocurría con el receptor mGlu7 el papel del receptor GABA<sub>B</sub> como modulador de la transmisión sináptica excitadora explica el potencial valor terapéutico que los ligandos de este receptor tienen en



el tratamiento de la epilepsia, concretamente en el caso de las crisis de ausencia (Marescaux y cols., 1992; Manning y cols., 2003).

Quizás, el papel fisiológico más conocido del receptor GABA<sub>B</sub> es su función en el control de la transmisión del dolor. Esta capacidad se debe a la presencia del receptor en los terminales gabaérgicos aferentes de las interneuronas del asta dorsal de la médula espinal (Price y cols., 1984), y de las neuronas de la raíz de los ganglios dorsales y del cerebro (Calver y cols., 2000; Margeta-Mitrovic y cols., 1999), donde modula la liberación de neurotransmisores como la sustancia P, glutamato y del péptido relacionado con la calcitonina (CGRP) (Malcangio y Bowery, 1993, 1995, 1996; Kangrga y cols., 1991; Kangrga y Randic, 1991). Estudios en animales apoyan los resultados anteriores y demuestran la eficacia antinociceptiva de algunos agonistas del receptor GABA<sub>B</sub>, tanto a nivel central como en la médula espinal (Ipponi y cols., 1999; Eaton y cols., 1999).

### 1.2.2. Receptor de adenosina A<sub>1</sub>.

#### **-Farmacología:**

Con el objetivo de lograr agonistas y antagonistas del receptor de adenosina A<sub>1</sub> más eficaces y selectivos, se han introducido modificaciones sobre la propia molécula de adenosina.

En general, la sustitución en el grupo amino exocíclico por grupos voluminosos como el radical ciclohexilo incrementa la afinidad por el receptor de adenosina del tipo A<sub>1</sub> (Jacobson y cols., 1991). Dentro de este grupo se incluyen la N6-R-fenilisopropiladenosina (R-PIA), N6-ciclopentiladenosina (CPA) y la N6- ciclohexiladenosina (CHA) (Ogadaki y Fuxe., 1995), que es el más potente de los tres. Otro grupo de agonistas del receptor de adenosina A<sub>1</sub> presentan modificaciones en el carbono en posición 2 de la adenosina, como por ejemplo la 2-cloro-ciclopentiladenosina (CCPA) (Klotz y cols., 1988). También existen agonistas parciales del receptor de adenosina A<sub>1</sub>, como la 5-etiltiociclopentiladenosina (5-etiltioCPA) (Borea y cols., 1994).

Los antagonistas del receptor de adenosina A<sub>1</sub> presentan una estructura distinta, ya que se trata de compuestos voluminosos formados por dos o tres heterociclos. Un grupo importante de antagonistas de este receptor son los derivados de la xantina, como la 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX) y la 8-[4-[[[(2-aminoetil)amino]carbonil]metil]oxi]fenil]1,3-dipropilxantina (XAC) (Lohse y cols., 1987; Muller, 2001). Hay antagonistas de este receptor que no son xantinas, como el CGS 15943 (William y cols., 1987).

### **-Mecanismos de señalización:**

El receptor de adenosina A<sub>1</sub> modula la transmisión sináptica tanto a nivel postsináptico, mediante la regulación de las corrientes de potasio, como presináptico, reduciendo la liberación de neurotransmisores mediante la inhibición de la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje. En general, las acciones de este receptor están mediadas por la activación de las proteínas del tipo Gi/o (Klinger y cols., 2002).

A nivel postsináptico, el receptor de adenosina A<sub>1</sub> controla la excitabilidad de la célula debido a la hiperpolarización drástica que produce mediante la activación de los canales de potasio (Greene y Haas, 1991, Patel y cols., 2001) que parecen ser del tipo GIRK (Gerber y cols., 1989; Wetherington y Lambert, 2002; Takigawa y Alzheimer, 2002).

A nivel presináptico, el receptor adenosina A<sub>1</sub> se considera un prototipo de receptor metabotrópico que controla la transmisión sináptica (Franco y cols., 2005; Wong y cols., 2006), ya que regula la exocitosis de múltiples neurotransmisores incluyendo glutamato (Dolphin y Archer, 1983; Barrie y Nichols, 1993; Ladera y cols., 2007) y GABA (Hollins y Stone, 1980; Saransaari y Oja, 2005). El mecanismo de señalización propuesto para esta acción inhibitoria es la reducción de la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje por un mecanismo delimitado de membrana (Fredholm y Dunwiddie, 1988; Gonçalves y cols., 1991; Scholz and Miller; 1991, Ambrosio y cols., 1996; Kimura y cols., 2003; Moore y cols., 2003, Manita y cols., 2004; Gundlfinger y cols., 2007). Así, el receptor de adenosina A<sub>1</sub> inhibe los canales de calcio del tipo N sensibles a  $\omega$ -conotoxina-GVIA ( $\omega$ -conotoxina-GVIA) en el hipocampo (Scholz y Miller, 1991; Wu y Saggau, 1994; Manita y cols., 2004; Gundlfinger y cols., 2007) y en otras regiones cerebrales (Song y cols., 2000; Noguchi y Yamashita, 2000; Wang y cols., 2002), mientras que  $\omega$ -agatoxina-IVA ocluye las acciones de los agonistas del receptor de adenosina A<sub>1</sub> en el hipocampo (Wheeler y cols., 1994; Ambrosio y cols., 1997; Gundlfinger y cols., 2007) y en la sinapsis del cáliz de Held (Kimura y cols., 2003; Yang y cols., 2006) lo que pone de manifiesto la capacidad de este receptor para modular los canales de calcio del tipo P/Q. Sin embargo, se desconoce si esta modulación se debe a un mecanismo directo o por el contrario se trata de un mecanismo que depende de la modulación previa de los canales de potasio (Tibbs y cols., 1989; Yang y cols., 2007). En las terminaciones sinápticas de la corteza cerebral de rata adulta, donde los canales de calcio de tipo N y P/Q se expresan en subpoblaciones de terminaciones sinápticas diferentes (Millán y cols., 2003) el receptor de adenosina reduce la liberación de glutamato y la entrada de calcio

inducidas por despolarización tanto en terminaciones sinápticas con canales de calcio de tipo N como de tipo P/Q (Ladera y cols., 2007).

El receptor del tipo A<sub>1</sub> se diferencia de otros receptores de adenosina porque presenta un acoplamiento negativo a la adenilato ciclasa (Dunwiddie y Fredholm, 1989; Fredholm y cols., 1986, Selley y cols., 2004; Marks y cols., 2005). Como en el caso de los receptores mGlu7 y GABA<sub>B</sub>, el acoplamiento del receptor de adenosina A<sub>1</sub> a esta vía de señalización también tiene repercusiones en la liberación de glutamato. De este modo, en las terminaciones sinápticas de la corteza cerebral, el receptor de adenosina A<sub>1</sub> reduce la liberación de glutamato la liberación de glutamato inducida por la activación de la vía adenilato ciclasa/PKA con forskolina (Ladera y cols., 2007). Además de modular los niveles de AMPc intracelulares, el receptor de adenosina A<sub>1</sub>, interviene en la síntesis de otros segundos mensajeros a través de la activación de la fosfolipasa C $\beta$  y la fosfolipasa A2 (Akbar y cols., 1994; Freund y cols., 1994; Jockers y cols., 1994; Gerwins y Fredholm., 1995).

### **-Relevancia fisiológica:**

La función neuroprotectora del receptor de adenosina A<sub>1</sub> se conoce desde hace bastante tiempo (Rudolphi y cols., 1992; Ongini y Schubert, 1998; von Lubitz, 1999). La adenosina se encuentra a bajas concentraciones en el líquido extracelular (entre 30 y 300 nM), pero llega a alcanzar concentraciones del orden de micromolar tras episodios de hipoxia ó isquemia. Este aumento tan significativo podría activar receptores A<sub>1</sub> y prevenir del daño celular, como sugieren estudios realizados en cultivos neuronales (Goldber y cols., 1988; Daval y Nicolas, 1994, Lynch y cols., 1998). Estos resultados concuerdan con estudios realizados *in vivo* mediante el empleo de modelos animales de isquemia global y focal en los que la administración local de agonistas del receptor de adenosina A<sub>1</sub> disminuyó la pérdida celular a asociada a los procesos de isquemia (Evans y cols., 1987) o epilepsia (Vianna y cols., 2005; Fedele y cols., 2006; Kochanek y cols., 2006; Hosseinmardi y cols., 2007).

El receptor de adenosina A<sub>1</sub> podría ejercer su efecto neuroprotector mediante distintos mecanismos. A nivel presináptico, este receptor reduce la liberación de neurotransmisores excitadores como glutamato, que liberado en exceso al espacio sináptico, vía receptores ionotrópicos, podría aumentar en exceso el calcio citosólico y provocar así la muerte celular (Uchino y cols., 2001). Por otro lado, el exceso de la entrada de calcio al interior de la célula podría evitarse también mediante la acción inhibidora del receptor de adenosina A<sub>1</sub> sobre los canales de calcio dependientes de voltaje (de Mendonça y cols., 2000).

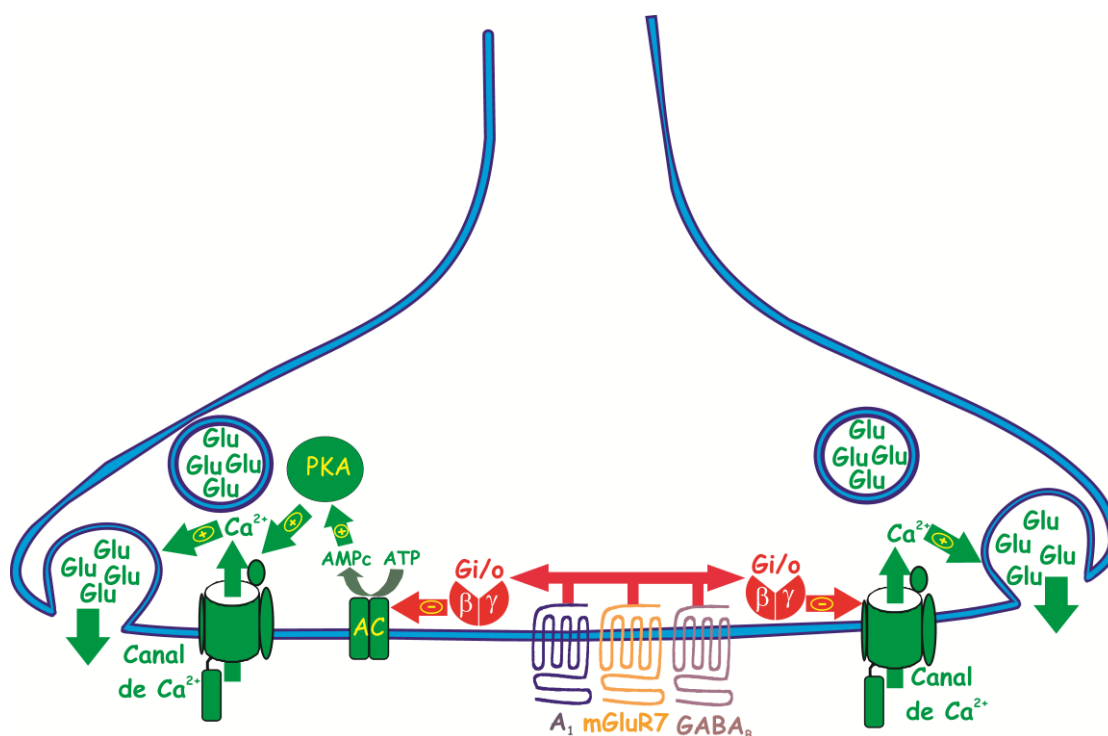
En la postsinapsis, este receptor podría activar los canales de potasio e hiperpolarizar la neurona postsináptica (Wardas, 2002), con la consiguiente disminución de la excitabilidad neuronal.

El receptor de adenosina A<sub>1</sub> también parece estar implicado en la transmisión del estímulo doloroso, sirva de ejemplo el reciente estudio que relaciona la activación de este receptor con el efecto analgésico local de la técnica de acupuntura (Goldman y cols., 2010).

### **1.3. Coexistencia y cooperación de los receptores mGluR7, GABA<sub>B</sub> y A<sub>1</sub> en la modulación de la liberación de glutamato.**

Como ya se ha comentado, tanto el autorreceptor, mGlu7, como los heterorreceptores, adenosina A<sub>1</sub> y GABA<sub>B</sub>, controlan la transmisión sináptica excitadora inhibiendo la liberación del neurotransmisor glutamato (Fredholm y Dunwiddie, 1988; Greene y Haas, 1991; Wu y Saggau, 1994 y 1995 b; Dittman y Regehr, 1996; O'Connor y cols., 1999; Capogna, 2004; Millán y cols., 2002a, 2002b). Además, estos receptores se distribuyen ampliamente en el sistema nervioso central, localizándose en la zona activa presináptica (Bradley y cols., 1996; Shigemoto y cols., 1997; Ochiisi y cols., 1999; Kulik y cols., 2003 y 2006; López-Bendito y cols., 2004). Estos hechos sugieren que los tres receptores coexisten en las terminaciones sinápticas glutamatérgicas. En este sentido, los estudios de imagen de calcio e inmunocitoquímica realizados por nuestro grupo en terminaciones sinápticas individuales han aportado evidencias directas de que estos receptores coexisten en una subpoblación de terminaciones sinápticas de la corteza cerebral (Ladera y cols., 2007). De este modo, en aquellos botones sinápticos en los que la activación de uno de los tres receptores bloqueó la entrada de calcio inducida por despolarización con KCl, también lo hizo la activación de cualquiera de los otros dos receptores. Lo que concuerda con los trabajos realizados en la sinapsis del cáliz de Held, cuyo tamaño permite registrar los canales de Ca<sup>2+</sup> presinápticos, se ha observado que las acciones de los agonistas del receptor GABA<sub>B</sub>, adenosina A<sub>1</sub> y un receptor metabotrópico del grupo III de alta afinidad por L-AP4 se ocluyen cuando los receptores se activan simultáneamente (Kimura y cols., 2003; Takahashi y cols., 2004). Sin embargo, la inhibición de los canales de calcio no es la única vía de señalización que comparten estos receptores. Así, en las terminaciones nerviosas de la corteza cerebral, la co-adición de los agonistas de los receptores mGlu7, adenosina A<sub>1</sub> y GABA<sub>B</sub> inhibe la liberación de glutamato inducida por la activación de adenilato ciclasa con forskolina a concentraciones

que no tienen efecto cuando se aplican por separado (concentraciones subumbrales) (Ladera y cols., 2007). Por tanto, todos estos datos indican que los tres receptores utilizan vías de señalización intracelular comunes para inhibir la liberación de glutamato (inhibición de la actividad de los canales de calcio e inhibición de la adenilato ciclasa) de modo que sus respuestas se integran desde la cooperación para alcanzar una inhibición efectiva a concentraciones subumbrales de agonista, hasta una clara oclusión de las respuestas a altas concentraciones de agonista (fig. I. 3).



**Figura I. 3. Coexistencia de los receptores de adenosina A<sub>1</sub>, GABA<sub>B</sub> y mGluR7.**

Los receptores adenosina A<sub>1</sub>, GABA<sub>B</sub> y mGlu7 coexisten en una población de terminaciones sinápticas glutamatérgicas de la corteza cerebral. Las acciones debidas a su activación se integran a nivel de la inhibición de los canales de calcio y de la adenilato ciclasa y tienen como resultado final la reducción de la liberación de glutamato.

**-Relevancia fisiológica:**

La coexistencia de los receptores de adenosina A1, GABAB y mGluR7 podría tener importantes consecuencias en la transmisión sináptica. El incremento de la concentración extracelular de adenosina por la actividad sináptica se ha relacionado con la activación del receptor NMDA (Brambilla y cols., 2005) y con la hidrólisis del ATP por ATP-*asas* extracelulares (Dunwiddie and Masino, 2001). Sin embargo, la liberación de glutamato y GABA se produce en poblaciones bien definidas de neuronas que utilizan estos aminoácidos como neurotransmisores (Somogyi et al., 1998). De ahí que la co-expresión de receptores de glutamato y GABA en el mismo botón sináptico pudiera ser relevante en dos escenarios diferentes: uno sería el “spillover”, es decir, la difusión de un neurotransmisor hasta sinapsis vecinas (Eder et al., 2003), mientras que el segundo sería la coliberación de glutamato y GABA desde el mismo botón sináptico (Gutierrez, 2005). En general, se puede afirmar que los transportadores de glutamato previenen la acumulación del glutamato en la sinapsis limitando sus acciones a los sitios sinápticos (Arnth-Jensen y cols., 2002, Huang y cols., 2004). Sin embargo, cuando las neuronas disparan con alta frecuencia, el glutamato liberado difunde de los sitios sinápticos alcanzando receptores extrasinápticos e incluso a la sinapsis vecina (Barbour y cols., 1994, Kullmann y cols., 1996; Mitchell y cols., 2000). Si esta comunicación intersináptica tuviera relevancia fisiológica en la función cerebral, cabría esperar que los terminales sinápticos estuviesen dotados con autorreceptores, para responder al neurotransmisor liberado por el propio terminal sináptico y con heterorreceptores, para responder al neurotransmisor liberado por los terminales vecinos.

El hallazgo de que mGluR7 y GABA<sub>B</sub> cooperen en la inhibición de la liberación de glutamato indica que los dos receptores se co-expresan en terminales glutamatérgicos, los cuales representan hasta el 80% de los botones sinápticos en la preparación de corteza cerebral (Millán y cols. 2003). Esto está de acuerdo con la expresión de mGluR7 y de los receptores GABA<sub>B</sub> en sinapsis asimétricas (Dalezios y cols., 2002; Kulik y cols., 2003) donde funcionan como autorreceptores y heterorreceptores, respectivamente (Wu y Saggau, 1994; O'Connor y cols., 1999). La coexistencia de receptores que utilizan una vía de señalización común en un botón sináptico puede tener importantes consecuencias funcionales, ya que aumentaría significativamente la probabilidad de activación del mecanismo presináptico que inhibe la liberación. Esto sería particularmente relevante si uno de los receptores exhibe una afinidad por el agonista endógeno excepcionalmente baja como es el caso de mGluR7 (Okamoto et al., 1994), lo que limita su activación a periodos de intensa

actividad sináptica (Pelkey et al., 2005). La coexpresión de receptores presinápticos también podría ser relevante en el contexto de la coliberación de glutamato y GABA desde el mismo terminal sináptico. En algunos tipos de neuronas, como las granulares de hipocampo, se ha descrito la expresión de un doble fenotipo glutamatérgico y GABAérgico (Gutiérrez y cols., 2005). Sin embargo, la capacidad de las terminaciones sinápticas de la corteza cerebral para coliberar glutamato y GABA no ha sido estudiada.

## **2. Canales de calcio dependientes de voltaje.**

Los canales de calcio dependientes de voltaje se encuentran en las células excitables y permiten el paso del ión calcio al citosol. El calcio actúa como un segundo mensajero, iniciando cascadas de señalización intracelulares que controlan la contracción celular, la secreción o la transmisión sináptica (Catterall, 2000). En el sistema nervioso central, estos canales son especialmente abundantes en las terminaciones sinápticas, donde ejercen un importante papel en el inicio de la exocitosis de neurotransmisores.

### **2.1. Estructura general.**

Los canales de calcio se aislaron por primera vez de las membranas de los túbulos transversales del músculo esquelético. Inicialmente se describieron como canales compuestos por tres subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Curtis y Catterall, 1984 y 1985), hasta que años más tarde se identificó la cuarta subunidad  $\alpha_2\delta$  (Hosey y cols., 1987; Leung y cols., 1987; Striessnig y cols., 1987; Takahashi y Catterall, 1987). En general, los canales de calcio están formados por una subunidad principal ( $\alpha_1$ ) y tres subunidades accesorias ( $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\alpha_2\delta$ ). La subunidad  $\alpha_1$  es transmembranal y constituye el canal iónico (Tanabe y cols., 1987) (fig I. 4). Está formada por cuatro dominios (de I a IV) unidos por bucles intracelulares. Cada uno de estos 4 dominios contiene seis segmentos transmembrana (de S1 a S6) (Catterall, 1993, 2000). La subunidad  $\alpha_1$  es el núcleo funcional del canal de calcio ya que es la que permite la entrada de calcio, contiene el sensor de voltaje y los sitios de unión de los bloqueantes (Catterall, 2000). En los mamíferos superiores, existen 10 genes que codifican 10 subunidades  $\alpha_1$  diferentes; la homología entre las distintas subunidades  $\alpha_1$  se ha usado como criterio para definir tres familias distintas de canales de calcio dependientes de voltaje ( $Ca_v1$ ,  $Ca_v2$  y  $Ca_v3$ ) (Snutch y cols., 2005).

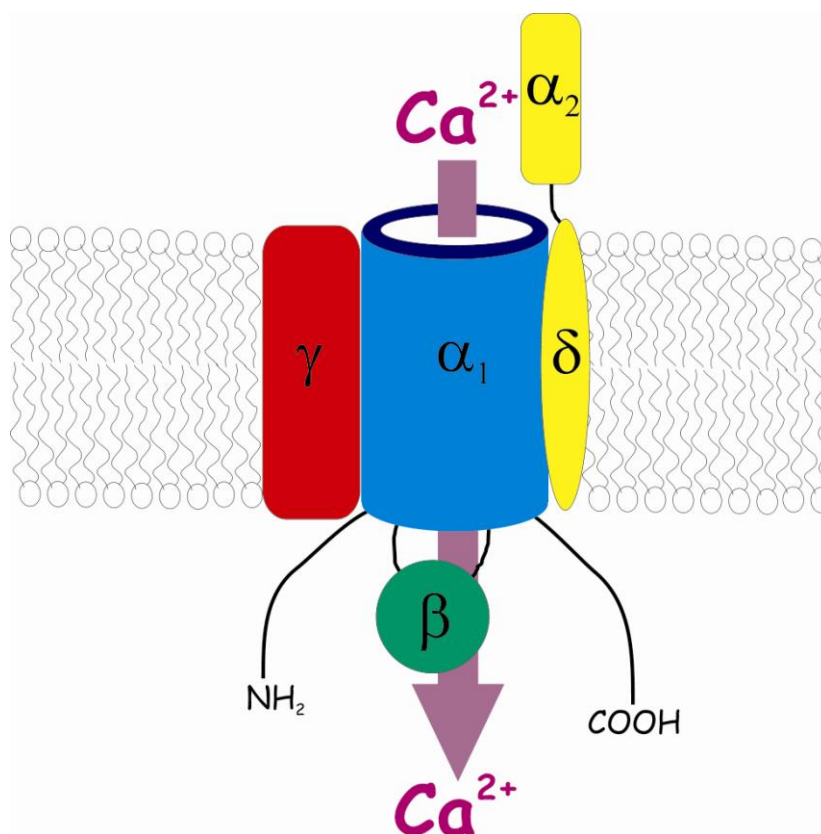
En cuanto a la subunidad  $\beta$ , los vertebrados expresan cuatro tipos diferentes de esta subunidad ( $\beta_{1-4}$ ) (Dolphin, 2003; Richards y cols., 2004). De todas ellas, sólo el subtipo  $\beta_{2a}$  está anclada a la membrana por palmitoilación (Qin y cols., 1998); el resto son intracelulares (fig. I. 4) y tienen estructura de hélice  $\alpha$  (Takahashi y Caterall, 1987; Ruth y cols., 1989). El análisis cristalográfico de su estructura revela que poseen dominios guanilato kinasa y SH3, por tanto, podrían interaccionar con otras subunidades  $\beta$  (Chen y cols., 2004; Opatowsky y cols., 2004; Van Petegem y cols., 2004). Mientras que la subunidad  $\alpha_1$  contiene la mínima maquinaria para establecer un canal de calcio funcional, la subunidad  $\beta$  regula las propiedades eléctricas y cinéticas del poro iónico (Pragnell y cols., 1994; Chien y cols., 1995; Bichet y cols., 2000a, 2002b; Yasuda y cols., 2004; Vendel y cols., 2006) y la expresión de los canales en la membrana celular, posiblemente por su interacción con proteínas implicadas en la endocitosis como es el caso de dinamina (González-Gutiérrez y cols., 2007).

La subunidad  $\gamma$  es una glicoproteína transmembranal (fig. I. 4) compuesta por cuatro hélices transmembranales y con extremos amino y carboxilo terminales citosólicos. Existen 8 tipos diferentes de esta subunidad (Jay y cols., 1990; Arikath y Campbell, 2003; Black, 2003). Con excepción de  $\gamma_7$ , cuya expresión en sistemas de expresión heteróloga reduce la actividad de los canales  $\text{Ca}_v2.2$  (Moss y cols., 2002), esta subunidad parece tener pocos efectos sobre la cinética de apertura del poro iónico  $\alpha_1$  (Rousset y cols., 2001). Además, su expresión en tejido neuronal es cuestionada (Dolphin, 2003; Chen y cols., 2007).

En los vertebrados, se han identificado y caracterizado 4 genes distintos que codifican las subunidades  $\alpha_2\delta_1$ ,  $\alpha_2\delta_2$ ,  $\alpha_2\delta_3$  y  $\alpha_2\delta_4$  (Klugbauer y cols., 1999; Arikath y Campbell, 2003). Cada subunidad  $\alpha_2\delta$  proviene de un péptido único que, posteriormente, sufre una modificación postraduccional que lo divide en los segmentos  $\alpha_2$  (extracelular) y  $\delta$  (compuesta por una hélice transmembranal simple) que, finalmente, son reconectados mediante puentes disulfuro (De Jongh y cols., 1990) (fig. I. 3). Mediante la coexpresión de esta subunidad con  $\alpha_1$  en sistemas heterólogos, se ha determinado que la subunidad  $\alpha_2\delta$  regula la amplitud de la corriente, la farmacología e incluso la apertura del canal de calcio (Klugbauer y cols., 2003; Yasuda y cols., 2004). Además, mutaciones en esta subunidad dan lugar a modelos de epilepsia en ratón que presentan una actividad claramente disminuida de las corrientes P/Q (Barclay y cols., 2001). También se ha observado que la interacción de esta subunidad con  $\alpha_1$  induce un cambio conformacional en esta última que aumenta su



afinidad por proteínas relacionadas con el transporte del canal de calcio a la membrana (Davies y cols., 2007).



**Figura I. 4. Estructura de los canales de calcio dependientes de voltaje.**

Esquema de la disposición de las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\alpha_2\delta$  de los canales de calcio dependientes de voltaje. La subunidad  $\alpha_1$  es transmembranal y constituye el poro iónico del canal de calcio. En cuanto a las subunidades auxiliares, la subunidad  $\beta$  es intracelular, la subunidad  $\gamma$  es transmembranal y la subunidad  $\alpha_2\delta$  presenta una parte transmembranal y otra extracelular. (Adaptado de Tedford y Zamponi, 2006).

## 2.2. Clasificación.

Los canales de calcio dependientes de voltaje se pueden clasificar en tres familias ( $\text{Ca}_v1$ ,  $\text{Ca}_v2$  y  $\text{Ca}_v3$ ) en función del tipo de subunidad  $\alpha_1$  que contienen (Ertel y cols., 2000; Snutch y cols., 2005):

### **-Familia $\text{Ca}_v1$ (canales de calcio de tipo L).**

Las corrientes de calcio mediadas por estos canales se caracterizan por presentar un umbral de activación alto, una conductancia elevada y una cinética de inactivación lenta (Tsien y cols., 1988; Bean, 1989 a). Los canales de calcio de tipo L están en el músculo esquelético, donde constituyen el sensor de voltaje que activa la contracción muscular (Tanabe y cols., 1987); en las células endocrinas, donde participan en la secreción hormonal (Milani y cols., 1990), en las células de la retina, participando en la fototransducción (Bech-Hansen y cols., 1998; Koschak y cols., 2003; McRory y cols., 2004) así como en las neuronas, regulando procesos de expresión génica (Bean, 1989a). Estos canales se regulan, principalmente, mediante la activación de proteínas quinasas dependientes de segundos mensajeros como la proteína quinasa A, que tiene efectos potenciadores sobre la entrada de calcio (Kamp y Hell, 2000). Los inhibidores específicos de estos canales de calcio son compuestos del grupo de las dihidropiridinas, fenilalquilaminas y benzotiazinas (Reuter, 1983).

### **-Familia $\text{Ca}_v2$ (canales de calcio de tipo P/Q, N y R).**

En 1985, Nowycky y colaboradores registraron por primera vez las corrientes de calcio mediadas por la activación de uno de estos canales, al que denominaron N ( $\text{Ca}_v2.2$  ó  $\alpha_{1B}$ ). Las corrientes N presentan una cinética de inactivación más lenta así como umbrales de activación e inactivación más negativos que los canales de calcio de la familia  $\text{Ca}_v1$ . Una de las herramientas farmacológicas más empleadas para el estudio de estos canales es la toxina peptídica procedente de los caracoles del género *Conus*,  $\omega$ -conotoxina GVIA, que bloquea el canal de manera irreversible (Olivera y cols., 1985; Tsien y cols., 1988). Posteriormente, mediante el empleo de la toxina peptídica procedente del veneno de la araña *Agelenopsis aperta*,  $\omega$ -agatoxina IVA, se diferenciaron otros dos tipos de corrientes de calcio con distinta afinidad a dicha toxina: las corrientes P, registradas por primera vez en las células de Purkinje (Llinás y cols., 1989) y las corrientes Q, que se registraron en las neuronas granulares de cerebelo (Randall y Tsien, 1995) y que presentan una menor afinidad por  $\omega$ -

agatoxina IVA. Es frecuente referirse a ellos como canales de calcio del tipo P/Q ( $\text{Cav}2.1$  ó  $\alpha_{1A}$ ). Por último, se encontró otro tipo de corrientes de calcio, las del tipo R ( $\text{Cav}2.3$  ó  $\alpha_{1E}$ ), llamadas así por ser resistentes tanto a  $\omega$ -conotoxina GVIA como a  $\omega$ -agatoxina IVA (Randall y Tsien, 1995). Estos canales se bloquean en presencia del antagonista SNX- 482 procedente del veneno de la tarántula africana *Histerocrates gigas* (Newcomb y cols., 1998; Bourinet y cols., 2001). Los canales del tipo N, P/Q y R son los más abundantes en el sistema nervioso central (Reid y cols., 2003). Los canales del tipo R se localizan tanto en las dendritas proximales como en los botones sinápticos (Wu y Saggau, 1995a; Yokoyama y cols., 1995; Wu y cols., 1998b) mientras que los canales del tipo N y P/Q se localizan preferentemente en los terminales sinápticos de las neuronas (Westenbroek y cols., 1992, 1995 y 1998) donde contribuyen a la liberación de los neurotransmisores (Turner y Dunlap, 1995; Vázquez y Sánchez-Prieto, 1997; Millán y cols., 2002a y b; Godino y cols., 2005; Ladera y cols., 2007 y 2008).

### **-Familia $\text{Ca}_v3$ (canales de calcio de tipo T).**

Las subunidades del tipo  $\text{Cav}3$  forman el poro de los canales de calcio del tipo T que se descubrieron, mediante el empleo de técnicas electrofisiológicas, en los huevos de la estrella de mar (Hagiwara y cols., 1975). Las corrientes T presentan un umbral de activación mucho más negativo, una cinética de inactivación más rápida y una conductancia al calcio menor que las corrientes L (Carbone y Lux, 1984; Fedulova y cols., 1985). Este tipo canales de calcio se expresa en los somas y dendritas, donde participan en la regulación de la excitabilidad neuronal (Molineux y cols., 2006).

## **2.3. Regulación de la actividad de los canales de calcio de la familia $\text{Ca}_v2$ .**

La actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje de la familia  $\text{Ca}_v2$ , está modulada por proteínas G, proteínas presinápticas de la maquinaria excitotóxica y proteínas quinasas como PKC.

Los canales de calcio de la familia  $\text{Ca}_v2$  se modulan por proteínas G, preferentemente del tipo  $\text{Gi/o}$  (Hille, 1994; Jones y Elmslie, 1997) (Fig.I.7). Las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas G reducen la actividad de los canales de calcio mediante un mecanismo delimitado de membrana (Bourinet y cols., 1996; Herlitze y cols., 1996; Ikeda, 1996) que aumenta el umbral de activación del canal, con el consiguiente retraso de su apertura (Dolphin, 1995; Hille, 1994;

Wickman y Clapham, 1995). Esta modulación es dependiente de voltaje, ya que desaparece cuando se aplica un prepulso de despolarización fuerte (+ 100 mV) (Bean, 1989; Lipscombe y cols., 1989, Hille, 1994; Arnot y cols., 2000, de Sevilla y cols., 2002). Mediante ensayos de unión a proteínas se ha encontrado que las subunidades  $\alpha_1$  contienen el menos tres sitios de unión a proteínas  $G\beta\gamma$  en su estructura, en el extremo amino y carboxilo terminal (Canti y cols., 1999; Page y cols., 1998; Qin y cols., 1997; Simen y Miller; 1998) y en el bucle que une los dominio I y II (LI-II) (Herlitze y cols., 1997; Zamponi y cols., 1997) (Fig.I.5). Este súltimo contiene un motivo QXXER necesario para la interacción con la proteína G (De Waard y cols., 1997; Herlitze y cols., 1997; Zamponi y cols., 1997). Sin embargo, el trabajo de Qin y colaboradores de 1997 demostró que dicho dominio no es esencial para la inhibición mediada por proteína G de los canales de calcio de tipo N. Del mismo modo, la pérdida de largas secuencias en el dominio carboxilo terminal tampoco afectaron en gran medida a la inhibición por proteínas G de este tipo de canales (Hamid y cols., 1999), lo que sugiere un mero papel auxiliar para este dominio; como posteriormente demostró el trabajo de Li y colaboradores de 2004. Sin embargo, el sitio de unión en el extremo amino terminal sí parece crucial en la inhibición de los canales de calcio de tipo N (Page y cols., 1998; Simen y Miller, 1998, 2000; Stephens y cols., 1998; Canti y cols., 1999). Concretamente, tres aminoácidos de este dominio (Ser<sup>48</sup>, Arg<sup>52</sup> y Arg<sup>54</sup>) son estrictamente necesarios para esta modulación (Canti y cols., 1999). El trabajo de Agler y colaboradores en 2005 resolvió el mecanismo mediante el que el dominio amino terminal de los canales de calcio de tipo N permitía la inhibición de las subunidades  $G\beta\gamma$ . Parece que la interacción entre dicho dominio y el dominio LI-II es absolutamente necesaria para la modulación por proteínas G.

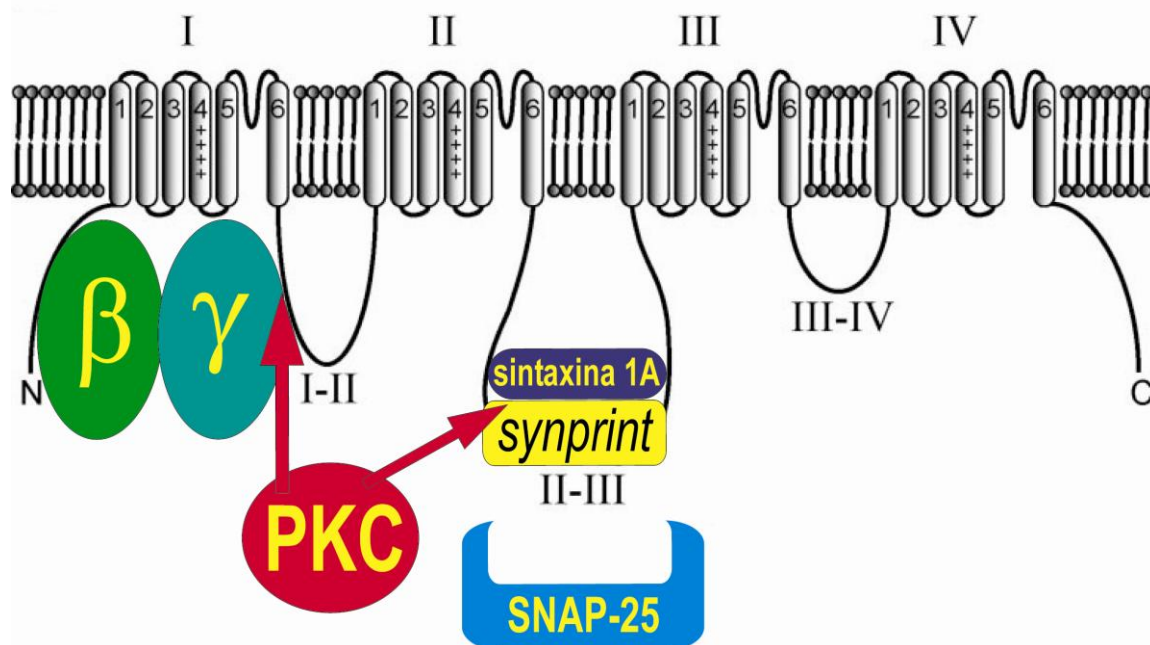
Las proteínas  $G\beta\gamma$  también modulan los canales de calcio mediante mecanismos que implican la participación de mensajeros solubles y que son independientes de voltaje (Tedford y Zamponi, 2006) y que implican a la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C $\beta$ , (Gao y Gilman, 1991; Tang y Gilman, 1991; Camps y cols., 1992). Un ejemplo lo constituyen algunos receptores metabotrópicos de dopamina D1 que activan G $\alpha_s$  y PKA (Surmeier y cols., 1995) o los receptores muscarínicos del tipo M1 y de neuroquinina del tipo 1 acoplados a G $\alpha_q$  y a la activación de PLC (Kammermeier y cols., 2000).

La sensibilidad a las proteínas G depende del tipo de canal de calcio (Zhang y cols., 1996). Las proteínas G modulan canales de calcio del tipo N (Herlitze y cols., 1996; Ikeda, 1996; Millán y cols., 2002a, Godino y cols., 2005) y del tipo P/Q (Perroy y cols., 2000), si bien los primeros son más susceptibles a este tipo de regulación (Zhang y cols., 1996; Currie y Fox, 1997; Millán 2002a y

b; González-Inchauspe y cols., 2007). Así, se ha observado un aumento en la sensibilidad a la modulación por proteínas G de canales P/Q recombinantes con el sitios de unión de las subunidades  $G\beta\gamma$  de los canales N (Zhang y cols., 1996; Page y cols., 1997).

Las proteínas de la maquinaria exocítica syntaxina-1; SNAP-25 o sinaptotagmina también regulan la actividad de los canales de calcio, por unión al dominio de interacción de proteínas sinápticas (*synprint*) del bucle que une los dominios II y III de la subunidad  $\alpha_1$  (Sheng y cols., 1994, 1997; Charvin y cols., 1997; Wiser y cols., 1997; Jarvis y Zamponi, 2001) (Fig.I.7). Esta unión podría optimizar el acoplamiento entre la señal de calcio y la exocitosis, incrementando la eficiencia de la liberación de los neurotransmisores (Mochida y cols., 1996, 2003; Harkins y cols., 2004). Además, la interacción de syntaxina 1A inhibe los canales de calcio de los tipos N y P/Q en ovocitos de *Xenopus* (Bezprozvanny y cols., 1995; Jarvis y Zamponi, 2001) y en sinaptosomas de corteza cerebral (Bergsman y Tsien, 2000) favoreciendo la inhibición del canal por proteínas G (Jarvis y cols., 2000 Hurley y cols., 2004). Además, la hidrólisis de syntaxina con toxina botulínica revierte esta modulación incrementando la actividad del canal (Degtiar y cols., 2000; Bergsman y Tsien, 2000; Stanley, 2003). Dado que la syntaxina 1A posee dominios de interacción tanto con los canales de calcio como con las subunidades  $G\beta\gamma$ , podría actuar como una chaperona forzando la interacción entre ambos y promoviendo, por tanto, la inhibición tónica por proteínas G (Jarvis y cols., 2002). Recientemente se ha observado que la proteína SNAP 25 endógena regula negativamente la actividad de los canales de calcio de tipo P/Q en terminaciones sinápticas glutamatérgicas del hipocampo (Condliffe y cols., 2010).

Se han propuesto tres mecanismos para la regulación de los canales de calcio de la familia Cav.2 por la proteína quinasa C. En primer lugar, PKC fosforila un residuo de treonina (Thr<sup>422</sup>) del dominio LI-II, impidiendo la interacción de la subunidad  $\alpha_1$  del canal de  $Ca^{2+}$  con las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas G y, por tanto, suprime la inhibición por proteínas G de los canales de  $Ca^{2+}$  (Hamid y cols., 1999). En segundo lugar, PKC también fosforila el dominio *synprint*, por lo que impidiendo así la unión y consiguiente inhibición de los canales de  $Ca^{2+}$  por las proteínas de la maquinaria exocitótica (Jarvis y Zamponi, 2001; Yokoyama y cols., 2005) (Fig.I.7). Por último, la fosforilación de los canales de calcio de tipo N por PKC también tiene un efecto directo sobre la actividad del canal, aumentando la conductancia al calcio de forma independiente de la interacción con subunidades  $\beta\gamma$  o con proteínas de la maquinaria exocitótica (Stea y cols., 1995, Hamid y cols., 1999).



**Figura I. 5. Estructura y sitios de regulación de la subunidad  $\alpha_1$ .**

Esquema de la estructura y  $\alpha_1$  y sus dominios de regulación donde se muestran los 4 dominios transmembranales (I-IV) y los 6 segmentos (S1-S6) que los constituyen. El segmento 4 actúa como sensor de voltaje. El extremo amino terminal y el bucle intracelular que une los dominios I y II interaccionan con las subunidades  $G\beta\gamma$ . El bucle intracelular que une los dominios II y III presenta el dominio *synprint* de interacción con las proteínas syntaxina y SNAP-25. La proteína quinasa C (PKC) fosforila los bucles I-II y II-III regulando la interacción de la subunidad  $\alpha_1$  con las proteínas G y las proteínas de la maquinaria exocitótica. (Adaptado de Tedford y Zamponi, 2006).

## 2.4. Función de los canales de calcio de la familia $Ca_v2$ .

Los canales de calcio de esta familia están localizados preferentemente en las terminaciones sinápticas (Wu y Saggau, 1995a; Yokoyama y cols., 1995; Wu y cols., 1998b), por tanto, su papel principal es promover la exocitosis de neurotransmisores (Westenbroek y cols., 1992, 1995 y 1998). No obstante, existen diferencias notables entre los diferentes tipos de canales de esta familia.

Como ya se ha comentado, los canales de tipo N poseen una mayor susceptibilidad a la inhibición por proteínas G que los de tipo P/Q (Zhang y cols., 1996; Currie y Fox, 1997; Millán 2002a, 2002b; González-Inchauspe y cols., 2007). Por otro lado, estos dos tipos de canales también se diferencian en su eficiencia en el acoplamiento a la exocitosis de neurotransmisores. Así, la liberación de glutamato mediada por canales de tipo N es más susceptible a la disminución del calcio extracelular (Millán y cols., 2003; González-Inchauspe y cols., 2007), lo que evidencia el peor acoplamiento de este tipo de canales a la

liberación de neurotransmisores, posiblemente porque se localizan más lejos de los sitios de liberación (Wu y cols., 1999; Qian y Noebels, 2001). Puesto que los distintos tipos de canales de calcio poseen diferentes propiedades esto debería repercutir en el papel que éstos juegan en la liberación de neurotransmisores.

Durante el desarrollo tienen lugar cambios en la dotación de canales de calcio de las terminaciones sinápticas. En los botones sinápticos de las ratas jóvenes, más de un tipo de canal controla la entrada de calcio, ya que los efectos de los bloqueantes de los canales sobre las corrientes de calcio son aditivos mientras que sus efectos sobre la transmisión sináptica no lo son (Hessler y cols., 1993; Reuter, 1995; Mintz y cols., 1995; Qian y Noebels, 2001; Millán y cols., 2002b; Murakami y cols., 2002; Fedchyshyn y Wang, 2005). Efectivamente, la distribución de los canales de calcio de los botones sinápticos de la corteza cerebral de las ratas jóvenes es heterogénea, ya que éstos expresan canales N o P/Q o una combinación de los dos tipos (Millán y cols., 2002b; Reid y cols., 2003). En el cáliz de Held (Wu y cols., 1999; Fedchyshyn y Wang, 2005; González-Inchauspe y cols., 2007) y en otras sinapsis (Iwashaki y cols., 2000), la contribución de los canales N a la transmisión sináptica disminuye con el desarrollo hasta que, en la edad adulta, toda la liberación de glutamato depende de los canales de tipo P/Q. No obstante, las terminaciones sinápticas de la corteza cerebral de animales adultos, conservan una parte sustancial de la liberación controlada por canales de calcio de tipo N (Vázquez y Sánchez-Prieto, 1997; Iwasaki y cols., 2000; Millán y cols., 2002b y 2003). Así, los experimentos de imagen de calcio realizados en botones sinápticos individuales ponen de manifiesto que, a diferencia de en los animales jóvenes, en las terminaciones sinápticas de ratas adultas los canales de calcio de tipo N y P/Q se expresan en subpoblaciones distintas (Millán y cols., 2003).

El hecho de que en algunas sinapsis centrales, la liberación de glutamato esté mediada exclusivamente por canales de tipo N sugiere que éstos tienen propiedades funcionales diferenciales, como confirman las profundas diferencias entre los fenotipos de los ratones que carecen de canales de calcio de uno u otro tipo. Así, a pesar de que los ratones que carecen de la subunidad  $\alpha_{1A}$  mantienen la transmisión sináptica gracias principalmente a los canales de tipo N y en menor medida a los canales de tipo R (Piedras-Rentería, 2004; Gonchález-Inchauspe y cols., 2007), estos animales mueren a las dos o tres semanas de vida (Jun y cols., 1999), edad que coincide exactamente con la total segregación de los canales de calcio de tipo N y P/Q en las terminaciones sinápticas de la corteza cerebral (Millán y cols., 2002 b).

En cambio, en los ratones carentes de la subunidad  $\alpha_{1B}$  ( $\alpha_{1B}/-$ ) los canales del tipo P/Q sí parece que compensen la ausencia de los canales del

tipo N ya que estos ratones tienen una expectativa de vida normal (Ino y cols., 2001). Así, en algunas sinapsis del bulbo olfatorio de los ratones  $\alpha_{1B}$   $-/-$ , se ha detectado un aumento de entre 3 y 4 veces del ARNm de la subunidad  $\alpha_{1A}$  que forma los canales del tipo P/Q (Takahashi y cols., 2004). La pérdida de los canales del tipo N conlleva, no obstante, algunos cambios fenotípicos. Se han observado algunas alteraciones en la percepción de los estímulos dolorosos (Kim y cols., 2001; Saegusa y cols., 2002), hiperactividad, alteraciones en el ritmo circadiano y de la función simpática en los ratones  $\alpha_{1B}$   $-/-$ . Estos cambios están de acuerdo con el papel predominante de los canales del tipo N en la sinapsis entre las fibras aferentes nociceptivas y las neuronas del asta dorsal de la médula (Heinke y cols., 2004), en los terminales nerviosos del sistema simpático y en las regiones cerebrales implicadas en el control del estado de vigilia (Ino y cols., 2001; Beuckmann y cols., 2003). Además, la pérdida del canal de calcio de tipo N parece que puede afectar a los procesos de plasticidad sináptica a corto (González-Inchauspe y cols., 2007) y a largo plazo (Jeon y cols., 2007) así como al comportamiento de estos ratones, que presentan un incremento de la actividad locomotora y del tiempo en estado de alerta (Beuckmann y cols., 2003; Nakagawasai y cols., 2010) así como un fenotipo más agresivo (Kim y cols., 2009) y déficits en el aprendizaje y memoria espacial (Jeon y cols., 2007).

### **3. Modulación de la liberación de glutamato mediante la vía de señalización de PLC.**

#### **3.1. PLC.**

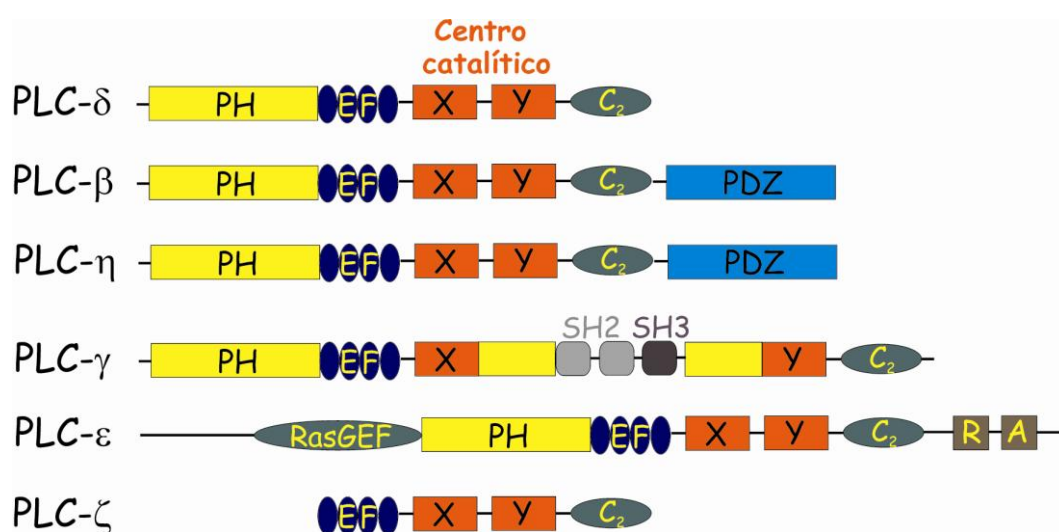
Las fosfolipasa específicas de fosfoinosítidos (PLC) poseen un papel esencial en la señalización transmembrana. Bajo el control de los receptores situados en la membrana plasmática, estas enzimas hidrolizan el fosfolípidos de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ) generando dos segundos mensajeros intracelulares: el inositol 1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ), que libera calcio de los reservorios intracelulares y el diacilglicerol (DAG), que activa a la proteína quinasa C así como a proteínas no quinasas como son las de la familia Munc 13 (Rhee y cols., 2002; Wierda y cols., 2007; Lou y cols., 2008).

En mamíferos, han sido identificadas al menos 13 isoformas de PLC pertenecientes a seis familias designadas como PLC $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  y  $\eta$ , de las cuales, sólo las PLC de las familias  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\eta$  se expresan abundantemente en el



cerebro (Rhee, 2001; Rebecchi y Pentyala, 2000; Hwang y cols., 2005). De este modo, las fosfolipasas de la familia  $\beta$  se expresan en el hipocampo (células piramidales y células granulares del giro dentado), tálamo, cerebelo (células de Purkinje y granulares), en la glándula pituitaria, cuerpo geniculado mediano, núcleo geniculado lateral así como en la corteza frontal y piriforme (Gerfen y cols., 1988; Homma y cols., 1989; Mizuguchi y cols., 1991; Rhee y cols., 1991; Suh y cols., 1988; Ross y cols., 1989; Roustan y cols., 1995; Tanaka y Kondo, 1994). Las isoformas de la familia  $\gamma$  se localizan en la pituitaria anterior, hipocampo, bulbo olfatorio y cerebelo (Mizuguchi y cols., 1991; Ross y cols., 1989; Yamada y cols., 1991; Tanaka y Kondo, 1994); y las fosfolipasas de la familia  $\eta$  son específicamente neuronales y se encuentran en el bulbo olfatorio, hipocampo (región CA y giro dentado), en las células cerebelares de Purkinje, corteza cerebral e hipotálamo (Hwuang y cols., 2005).

La estructura de todas las fosfolipasas C consta de un centro catalítico (formado por los dominios X e Y), un dominio amino terminal homólogo al de las plecstrinas (PH) separado del centro catalítico por 4 dominios dedos-EF (EF) y un dominio carboxilo terminal de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{C}_2$ ) (fig I. 6).



**Figura I. 6. Estructura de las distintas familias de PLC.**

El esquema respresenta las estructura de las diferentes familias de PLC. El dominio de homólogo al de la plecstrina (PH), los dominios manos-EF (EF), el centro catalítico (X e Y) y el dominio de unión a calcio ( $\text{C}_2$ ) aparecen en todas las familias de PLC, excepto en las PLC- $\zeta$ , que carece del dominio PH. Las familias  $\beta$  y  $\eta$  presentan un dominio PDZ que les permite interaccionar con los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G. Las PLC- $\gamma$  presentan dominios tirosina quinasa (SH2 y SH3) que posibilitan su activación por receptores tirosina quinasa. Las fosfolipasas de la familia  $\epsilon$  se activan mediante la unión de RasGTP a un dominio situado en el extremo carboxilo terminal (dominio de unión de Ras, RA) y la posterior transformación de RasGTP en Ras GDP mediante su dominio de intercambio de nucleótidos de guanina (RasGEF). (Adaptado de Cockcroft, 2006).

El dominio PH ancla a la enzima a la membrana mediante su interacción con PIP<sub>2</sub> (Essen y cols., 1996). Los dominios EF (capaces de unir un ión calcio) parece que confieren flexibilidad a la PLC, permitiendo así la interacción con la membrana del centro catalítico (responsable de la hidrólisis de PIP<sub>2</sub>) y del dominio C<sub>2</sub>, una vez que la enzima se ancla a la membrana por su dominio PH (Rhee, 2001). Las variaciones de esta estructura básica pueden determinar las propiedades de regulación de las distintas familias de fosfolipasas. Por ejemplo, mientras el dominio C<sub>2</sub> de las PLC- $\delta$  es capaz de unir hasta cuatro moléculas de calcio (Grobler y Hurley, 1998) y promover la formación de un complejo ternario PLC-fosfatidilserina-Ca<sup>2+</sup> que promueve la translocación de la enzima a la membrana (Lomasney y cols., 1999); este mismo dominio C<sub>2</sub> permite la interacción de las PLC- $\beta$  con las subunidades  $\alpha_q$  de las proteínas G, confirmando a esta familia la capacidad de ser activadas por receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (Park y cols., 1993; Wu y cols., 1993). Además, el extremo carboxilo terminal de las PLC- $\beta$  presenta un dominio adicional PDZ (fig. I. 6) que les permite interaccionar con los receptores acoplados a proteínas G (Rhee, 2001). Dado que, las recientemente descritas PLC- $\eta$  también poseen este dominio PDZ y, en general, una estructura muy similar a la de la familia  $\beta$ , es probable que compartan con éstas características funcionales. En este sentido, se sabe que ambas familias son activadas por subunidades G $\beta\gamma$  (Smrcka y Sternweis, 1993; Park y cols., 1993; Lee y cols., 1994; Zhou y cols., 2005), probablemente debido a la interacción de dichas subunidades con los dominios PH e Y de las enzimas (Sankaran y cols., 1998; Wang y cols., 2000). No obstante, no sólo las PLC de las familias  $\beta$  y  $\eta$  son susceptibles de modulación por las subunidades G $\beta\gamma$ . Así, aunque la forma principal de activación de las PLC- $\epsilon$  es la unión de RasGTP al dominio Ras (RA) y posterior transformación en RasGDP en el dominio de intercambio de nucleótidos de guanina (RasGEF) (fig I. 6), su acción también es potenciada por la interacción con por subunidades G $\beta\gamma$  (Wing y cols., 2001). Por tanto, al menos tres isoformas distintas de PLC pueden ser activadas por receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G como son, por ejemplo, los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I (Nicoletti y cols., 1986a; Manzoni y cols. 1990; Schoepp y cols., 1990; Houamed y cols., 1991; Masu y cols., 1991; Aramori y Nakanishi, 1992; Pin y cols., 1992; Pickering y cols., 1993; Ferraguti y cols., 1994; Hermans y cols., 1998).

Las fosfolipasas C de la familia  $\gamma$  poseen dominios homólogos a la proteína Src SH2 y SH3 (fig. I. 6) que les confieren la capacidad de activación

mediante su fosforilación por receptores tirosina kinasa como son los receptores de factores de crecimiento (Rhee, 2001).

Las distintas familias de PLC muestran diferencias en la sensibilidad al calcio intracelular, si bien todas las isoformas de PLC requieren calcio para su activación, ya que éste se va a unir en el centro catalítico de las enzimas, son las isoformas  $\delta$ ,  $\zeta$  y  $\eta$  las más sensibles a este catión, de este modo, podrían activarse a niveles de calcio citosólicos basales (Allen y cols., 1997; Saunders y cols., 2002; Hwuang y cols., 2005). Esto podría deberse a diferencias en los otros dominios reguladores, así, como ya se ha comentado, mientras el dominio C<sub>2</sub> de las PLC- $\delta$  puede unir hasta cuatro cationes de calcio (Grobler y Hurley, 1998), el mismo dominio de las PLC- $\beta$  no se comporta de la misma manera (Wang y cols., 1999). Las fosfolipasas  $\zeta$  carecen del dominio PH (fig.I. 6) y, por tanto, sólo podrían interaccionar con los fosfolípidos de membrana mediante el dominio C<sub>2</sub> de unión a calcio, como tampoco parece que se activen por proteínas G $\beta\gamma$  y, además, carecen de dominios tirosina quinasa, parece que el calcio es su principal fuente de activación, lo que explicaría su gran sensibilidad a las variaciones de calcio intracelular (Kouchi y cols., 2004).

### 3.2. PKC.

La proteína quinasa C constituye una familia de quinasas de serina y treonina que dependen de calcio y fosfolípidos. Un activador fisiológico de esta quinasa es el diacilglicerol (DAG), generado por la hidrólisis de fosfatidilinositoles estimulada por fosfolipasa C o por la hidrólisis de fosfatidilcolina inducida por fosfolipasa D. Se han descrito diez isoenzimas que se dividen en tres clases en función de su estructura. El primer grupo lo constituyen las isoformas clásicas o convencionales ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$ I y  $\beta$ II), que requieren calcio, DAG, fosfatidilserina, lisofosfatidilserina o ácidos grasos insaturados para su activación. El segundo grupo ó isoformas nuevas ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ /L,  $\theta$ ) no necesitan calcio para su activación, pero sí fosfatidilserina y DAG. Por último, las isoformas atípicas ( $\zeta$ ,  $\iota$ / $\lambda$ ) requieren únicamente fosfatidilserina para activarse, aunque la subespecie  $\zeta$  se activa también por ácidos grasos (Newton, 2001).

La proteína quinasa C se encuentra a altas concentraciones en el SNC, donde lleva a cabo importantes funciones en el desarrollo y en los fenómenos de plasticidad sináptica (Tanaka y Nishizuka, 1994). La potenciación de la transmisión por PKC se ha descrito en numerosas preparaciones

neuronales, como rodajas de tejido cerebral (Malenka y cols., 1986; Honda y cols., 2000; Francis y cols., 2002), sinaptosomas (Nichols y cols., 1987; Coffey y cols., 1993) y cultivos de neuronas (Capogna y cols., 1995; Kudoh y cols., 2001).

Uno de los mecanismos de acción propuestos para la facilitación por PKC conlleva el alargamiento de los potenciales de acción debido a la fosforilación de los canales de potasio y a la reducción de la corriente de salida de este ión (Gerber y cols., 1989; Barrie y cols., 1991; Herrero y cols., 1992 a; Coffey y cols., 1994). Esta acción de PKC sobre las corrientes de potasio supondría un alargamiento del potencial de acción y, por tanto, de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y de la liberación de neurotransmisor (Barrie y cols., 1991; Stea y cols., 1995; Hamid y cols., 1999).

Por otro lado, la fosforilación de la subunidad  $\alpha_1$  de los canales de calcio dependientes de voltaje interfiere con la inhibición de los canales por las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas G (Swartz y cols., 1993; Zamponi y cols., 1997; Herlitze y cols., 2001) de las proteínas de la maquinaria exocitótica (Jarvis y Zamponi, 2001; Yokoyama y cols., 2005). Ahora bien, dado que la facilitación de la corriente de calcio persiste en presencia de la toxina pertúsica parece que PKC afecta también de forma directa a las propiedades intrínsecas del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de manera independiente de proteínas G (Yang y Tsien, 1993; Stea y cols., 1995).

La activación de PKC con ésteres de forbol aumenta el número de vesículas dispuestas para ser liberadas (RRP, del inglés *ready releasable pool*) (Ghirardi y cols., 1992; Gillis y cols., 1996; Smith y cols., 1998; Silinsky y cols., 2003) y también mejora el acoplamiento entre calcio y exocitosis (Korogod y cols., 2007). Las proteínas sinápticas SNAP-25 (Kataoka y cols., 2000; Nagy y cols., 2002; Houelan y cols., 2007) y Munc18 (de Vries y cols., 2000; Barclay y cols., 2003; Craig y cols., 2003; Nili y cols., 2006) son fosforiladas por PKC. La fosforilación de Munc 18 favorece su disociación de syntaxina I permitiendo la formación del complejo SNARE (syntaxina, SNAP-25 y VAMP/sinaptobrevina) (Dulubova y cols., 1999; Verhage y cols., 2000, Misura y cols., 2000; de Vries y cols., 2000; Barclay y cols., 2003; Craig y cols., 2003; Nili y cols., 2006) y la hemifusión de la vesícula que quedaría así prepara para ser liberada.

### 3.3. Proteínas Munc 13.

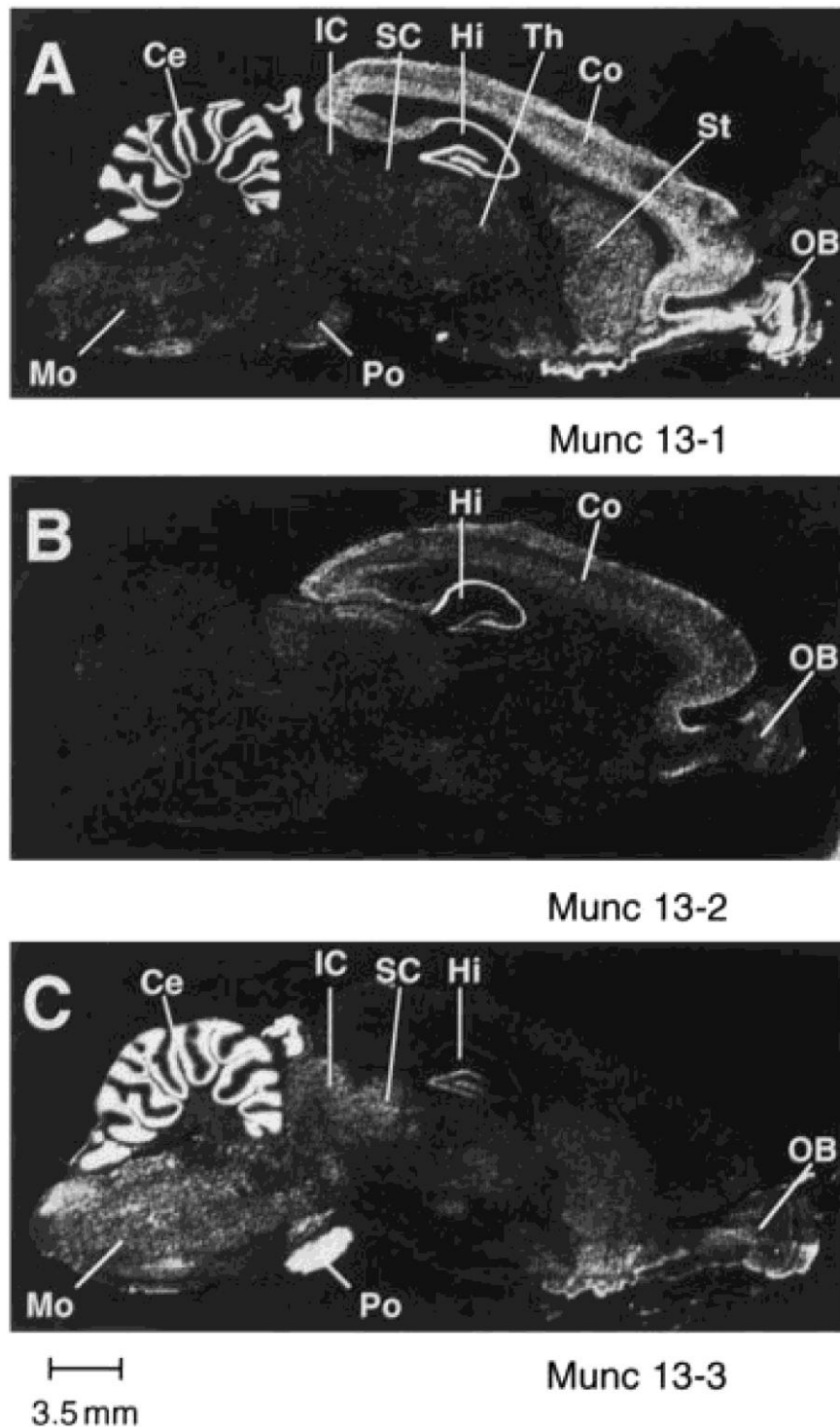
Aparte de activar de PKC, los ésteres de forbol también potencian la transmisión sináptica mediante la activación de proteínas no quinasas (pero que poseen un dominio C<sub>1</sub> de unión a diacilglicerol) como la familia de proteínas munc 13 (Rhee y cols., 2002; Wierda y cols., 2007; Lou y cols., 2008). Las proteínas munc 13 constituyen las formas homólogas en mamífero de la proteína Unc-13 de *Caenorhabditis elegans*. Se conocen tres isoformas distintas: Munc 13-1, Munc 13-2, denominada también bMunc 13-2 para diferenciarla de su variante de procesamiento alternativo ubMunc13-2, y Munc 13-3 (Augustin y cols., 1999; Betz y cols., 2001).

#### **-Patrón de expresión y localización subcelular:**

Aunque, a nivel subcelular, todas las isoformas de Munc 13 se localizan exclusivamente en la zona activa presináptica (Augustin y cols., 1999) y sólo se expresan en el cerebro [excepto ubmunc 13-2, que se encuentra también en otros tejidos (Betz y cols., 2001)] su patrón de expresión cerebral es diferente según la isoforma. De este modo, Munc 13-1 se expresa a lo largo de todo el cerebro (bulbo olfatorio, estriado, corteza cerebral, hipocampo y cerebelo), sin embargo, Munc 13-2 y Munc 13-3 presentan patrones de expresión complementarios; así, mientras que Munc 13-2 se expresa preferentemente en las regiones rostrales (bulbo olfatorio, corteza cerebral e hipocampo), Munc 13-3 queda restringida a las regiones caudales (cerebelo, tronco cerebral y núcleos pontinos) Por tanto, en las regiones rostrales Munc 13-1 se coexpresa con Munc 13-2 mientras que, en las regiones caudales, existe un solapamiento entre los patrones de Munc 13-1 y Munc 13-3 (Augustin y cols., 1999) (fig. I. 7). También existe una isoforma de Munc, denominada Munc 13-4, expresada en linfocitos T, que participa en la exocitosis de los gránulos citolíticos (Feldmann y cols., 2003).

Atendiendo a su localización subcelular, si bien las proteínas Munc 13 no presentan ninguna región transmembrana, sí están fuertemente asociadas a la fracción de membrana (Brose y cols., 1995) mediante su interacción con las proteínas que integran la red de la zona activa presináptica, como son las proteínas de la familia CAST (proteínas estructurales asociadas a la citomatriz de la zona activa) , la proteína de interacción con Rab3A (RIM) o la proteína Bassoon (Betz y cols., 2001; Deguchi-Tawarada y cols., 2004; Wang y cols., 2002; Ohtsuka y cols., 2002; Takao-Rikitsu y cols., 2004; Andrews-Zwilling y cols., 2006). Además, la activación de estas proteínas mediante la unión de

diacilglicerol provoca su translocación a la membrana plasmática (Betz y cols., 1998) donde interaccionan con syntaxina, activando así la formación del complejo SNARE (complejo receptor soluble de proteína de unión sensible a N-etilmaleimida) necesario para la preparación de las vesículas sinápticas para la exocitosis (Betz y cols., 1997, 1998 y 2001; Varoqueaux y cols., 2002; Rhee y cols., 2002; Basu y cols., 2007).

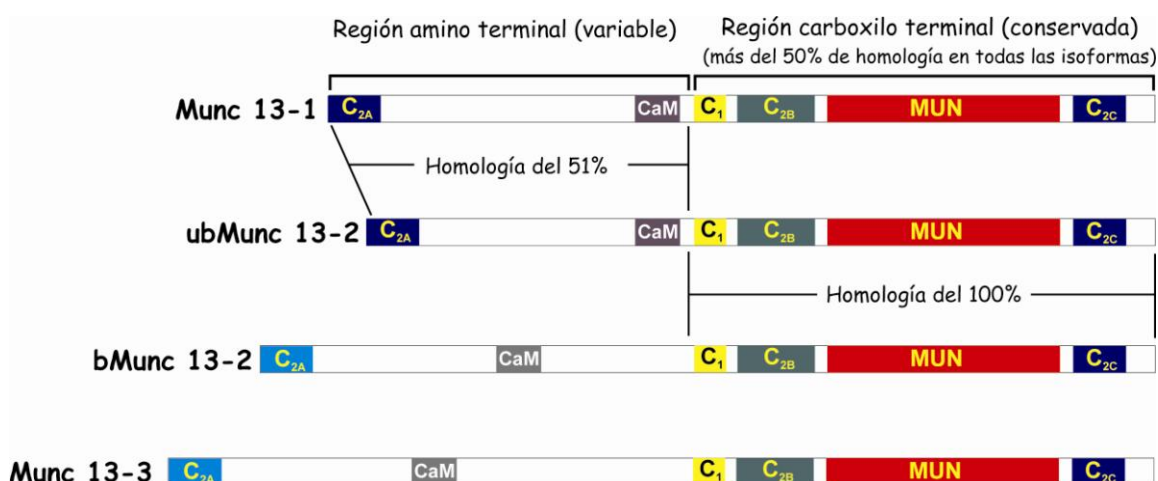


**Figura I. 7. Patrón de expresión de las proteínas Munc en el cerebro de rata.**

(A-C) Imágenes correspondientes a los negativos de una película de rayos X que muestran la distribución de los ARN mensajeros de las tres isoformas exclusivamente cerebrales de Munc [Munc 13-1 (A), Munc 13-2 (B) y Munc 13-3 (C)] y en las que se puede apreciar los patrones de expresión complementarios de Munc 13-2 [regiones rostrales del cerebro: bulbo olfatorio (OB), corteza cerebral (Co) y región CA del hipocampo (Hi)] y de Munc 13-3 [regiones caudales del cerebro: giro dentado del hipocampo (Hi), colículos superior e inferior (SC e IC), cerebelo (Ce), bulbo raquídeo (Mo) y núcleos pontinos (Po)]. Estos dos patrones de expresión solapan con el de Munc 13-1, que presenta una distribución mucho más amplia. Barra de escala 3,5 mm. (Adaptado de Augustin y cols., 1999).

**-Estructura:**

Las proteínas Munc 13 poseen una región carboxilo terminal muy conservada en todas las isoformas constituido por un dominio de unión a calcio ( $C_{2c}$ ) situado en la zona más distal, un largo dominio MUN compuesto por repeticiones de hélices  $\alpha$  (Basu y cols., 2005), así como otro dominio de unión a calcio ( $C_{2B}$ ) muy próximo al sitio de unión de diacilglicerol ( $C_1$ ) (fig. I. 8). Sin embargo, la región amino terminal presenta muchas diferencias entre las distintas isoformas. De este modo, aunque las variantes de procesamiento alternativo de Munc 13-2 (bMunc 13-2 y ubMunc 13-2) poseen un dominio carboxilo terminal con un 100% de homología, sus extremos amino terminal son totalmente diferentes. En cambio, los dominios amino terminal de Munc 13-1 y ubMunc13-2 presentan una homología del 52% pero son totalmente diferentes al resto de las isoformas (bMunc13-2 y Munc 13-3) (Betz y cols., 2001). No obstante, parece que todas ellas presentan un dominio de interacción con calmodulina, así como un tercer dominio de unión a calcio ( $C_{2A}$ ) (Dimova y cols., 2006) (fig. I. 8).



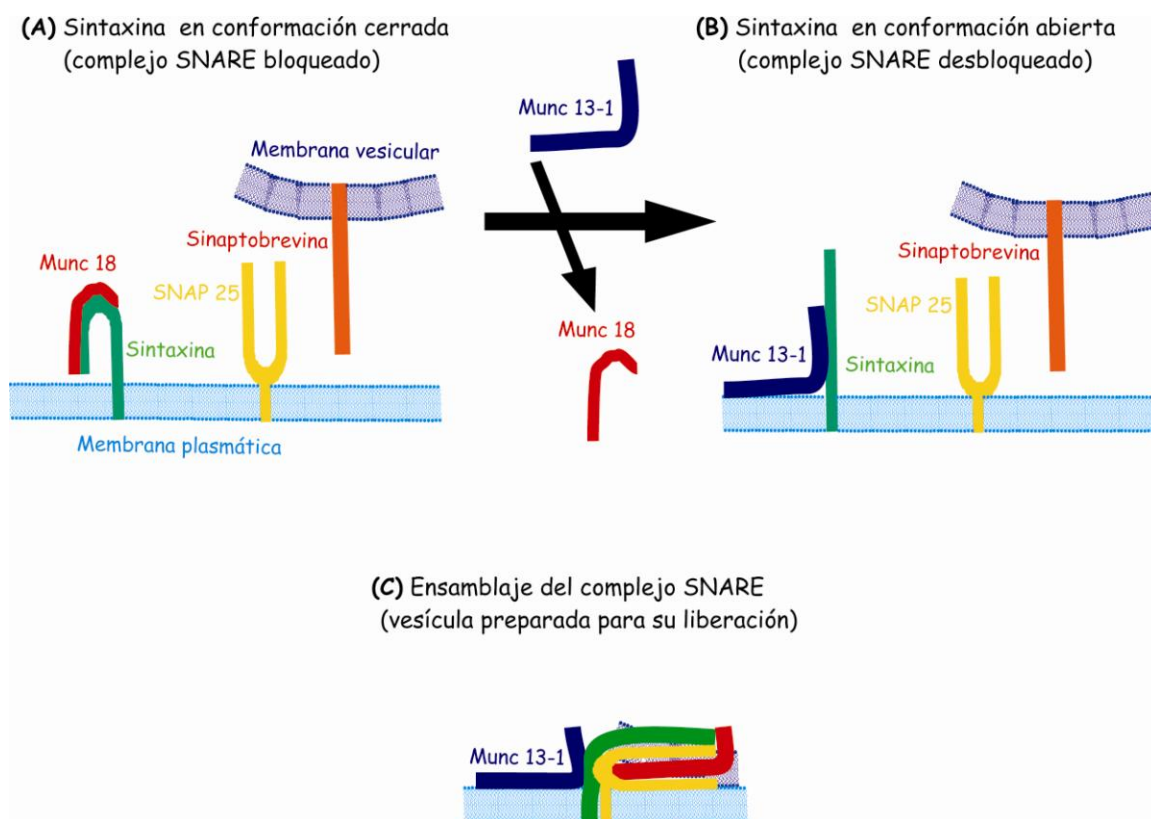
**Figura I. 8. Estructura de las proteínas de Munc 13.**

El esquema representa la estructura de las diferentes isoformas de Munc 13. Las proteínas Munc 13 poseen una región carboxilo terminal muy conservada en todas las isoformas compuesta por dos dominios de unión a calcio ( $C_{2B}$  y  $C_{2c}$ ) separados por un largo dominio MUN formado por repeticiones de hélices  $\alpha$ . Esta reregión también contiene el sitio de unión del diacilglicerol ( $C_1$ ). Las variantes de procesamiento alternativo de Munc 13-2 (ubMunc 13-2 y bMunc 13-2) poseen una región carboxilo terminal idéntica pero diferentes regiones amino terminal. Las regiones amino terminal de las isoformas Munc 13-1 y ubMunc 13-2 son muy parecidas y sus dominios de unión a calcio ( $C_{2A}$ ) y a calmodulina ( $CaM$ ) están muy bien descritos. En cambio, los dominios  $C_{2A}$  y  $CaM$  de bMunc 13-2 y Munc 13-3 no están bien establecidos, no obstante, estas proteínas también son capaces de interaccionar con calmodulina y parece que también poseen un tercer dominio de unión a calcio ( $C_{2A}$ ) (Betz y cols., 2001; Basu y cols., 2005; Dimova y cols., 2006).



El trabajo de Basu y colaboradores de 2005 puso de manifiesto que el extenso dominio MUN es el dominio mínimo de las proteínas Munc 13 capaz adoptar una estructura terciaria eficiente para desarrollar la función de preparación de las vesículas sinápticas para la fusión. Así, la sobreexpresión de dicho dominio fue capaz de reestablecer un 50% de la transmisión sináptica (comparada con las células donde se sobreexpresó la proteína Munc 13-1 completa) en cultivos celulares de ratones que carecían de Munc 13-1 y Munc 13-2. Sin embargo, este trabajo también puso de manifiesto que el 50 % de la transmisión sináptica restante requiere la participación de los dominios reguladores de unión a calcio, calmodulina y diacilglicerol. Esto está de acuerdo con el hecho de que los ratones que presentan una mutación en el dominio C<sub>1</sub> de Munc 13-1 que impide la unión de diacilglicerol mueran a las 2 horas de su nacimiento, al igual que ocurre con los ratones que carecen de la proteína completa (Rhee y cols., 2002; Varoqueaux y cols., 2002).

En un principio, a partir de los estudios funcionales en *C. elegans* (Richmond y cols., 2001) y de los experimentos de interacción proteína-proteína (Betz y cols., 1997), se elaboró un modelo en el cual dos fragmentos pequeños situados en el dominio MUN (MH1 y MH2) eran suficientes para interaccionar con syntaxina, favoreciendo la conformación abierta de esta proteína y el consiguiente ensamblaje del complejo SNARE (unión entre las proteínas de membrana SNAP 25 y syntaxina y la proteína vesicular sinaptobrevina que induce la hemifusión de las membranas vesicular y plasmática) necesario para la exocitosis de neurotransmisores (Brose y cols., 2000) (fig. I. 9). Sin embargo, el trabajo de Basu y colaboradores de 2005 demostró que el dominio mínimo de Munc 13-1 necesario para la preparación y exocitosis de las vesículas sinápticas era un dominio mucho más extenso que los dominios MH1 y MH2 y que, además, no era capaz de interaccionar con syntaxina. Por tanto, o el modelo funcional anterior está equivocado o la unión de syntaxina requiere la participación de los dominios reguladores de Munc 13.



**Figura I. 9. Modelo propuesto para la preparación por Munc 13-1 de las vesículas sinápticas para su exocitosis.**

(A) La proteína Munc 18 estabilizaría la conformación cerrada de sintaxina, impidiendo la formación del complejo SNARE. (B) La fosforilación de Munc 18 por PKC dejaría libre a la sintaxina (Wierda y cols., 2007) y la unión de Munc 13-1 estabilizaría la conformación abierta de esta proteína. (C) Esto posibilitaría la formación del complejo SNARE y la hemifusión de las vesículas plasmática y vesicular. De este modo, la vesícula sináptica estaría lista para ser liberada. (Adaptado de Brose y cols., 2000).

Por tanto, parece que los dominios reguladores de las proteínas Munc 13 también participan en el proceso preparación de las vesículas sinápticas para la fusión y, concretamente, son absolutamente imprescindibles para los procesos de plasticidad sináptica mediados por estas proteínas. De este modo, el dominio de unión de diacilglicerol, necesario para la translocación a membrana de estas proteínas, también es responsable de la potenciación sináptica inducida por los ésteres de forbol (Betz y cols., 1997, 1998 y 2001; Varoqueaux y cols., 2002; Rhee y cols., 2002; Basu y cols., 2007). Por tanto, parece probable que las proteínas munc 13 estén implicadas en la potenciación de la liberación inducida por la activación de fosfolipasa C que median algunos receptores metabotrópicos.

Por su parte, el dominio de unión a calcio  $C_{2B}$ , también es capaz de unirse a membranas plasmáticas enriquecidas en fosfatidilinositolfosfato y fosfatidilinositolbifosfato (PIP y  $PIP_2$ ), siendo esta propiedad necesaria para la

plasticidad sináptica a corto plazo; así, mientras las mutaciones que impiden la unión del dominio C<sub>2B</sub> a los fosfolípidos de membrana no afectan a la transmisión sináptica, sí suprimen la potenciación a corto plazo inducida por estimulaciones repetidas (Shin y cols., 2010).

Si bien todas las proteínas Munc pueden unirse a calmodulina de forma dependiente de calcio (Dimova y cols., 2006), sólo el dominio de unión a calmodulina de las isoformas Munc 13-1 y ubMunc 13-2, muy conservado evolutivamente, ha sido bien descrito (Dimova y cols., 2009; Rodríguez-Castañeda y cols., 2009). Dicho dominio está constituido por dos módulos independientes conectados por segmentos flexibles. Esta arquitectura modular le permite la formación escalonada de un intermediario Munc 13/calmodulina-2Ca<sup>2+</sup>, fruto de la interacción de uno de los módulos del dominio de Munc 13 con la calmodulina unida a 2 moléculas de calcio, así como del complejo Munc 13/calmodulina-4Ca<sup>2+</sup>, en el que ambos módulos del dominio de Munc 13 están unidos a la calmodulina, que presenta sus cuatro 4 sitios de unión a Ca<sup>2+</sup> ocupados (Rodríguez-Castañeda y cols., 2009). Estos dos estados pueden interconvertirse rápidamente en función de la concentración de calcio citosólica, confiriendo al complejo Munc 13/calmodulina la capacidad de actuar como un sensor de calcio muy eficiente. Esto coincide con los experimentos realizados en neuronas de hipocampo en cultivo, en los que la mutación del dominio de unión a calmodulina de Munc 13-1 y ubMunc 13-3 suprimió la potenciación de la liberación a corto plazo inducida tras una estimulación repetida, y por tanto, posiblemente causada por el incremento del calcio citosólico residual (Junge y cols., 2004).

Los efectos de la activación de cada uno de estos dominios reguladores (dominios de unión a calcio, diacilglicerol y calmodulina) van a integrarse para modular la función de las proteínas Munc 13. Así, por ejemplo, las mutaciones que incrementan la capacidad para unirse a los fosfolípidos de membrana del dominio C<sub>2B</sub> ocuyen la potenciación de la liberación inducida por los ésteres de forbol (Shin y cols., 2010).

Por último, el extremo amino terminal de las isoformas Munc 13-1 y ubMunc 13-2 también interacciona con la proteína de la zona activa RIM 1 (proteína de interacción con Rab 3A (Betz y cols., 2001). Parece que esta interacción es imprescindible para la función de cebado de vesículas así como para el reclutamiento de estas proteínas en la zona activa (Betz y cols., 2001; Andrews-Zwilling y cols., 2006).

**-Función:**

La función principal de las proteínas Munc 13 es la preparación de vesículas sinápticas para la fusión, mediante la activación del complejo SNARE. De este modo, las vesículas sinápticas van a quedar hemifusionadas a la membrana plasmática y dispuestas para ser liberadas en el momento en el que un potencial de acción llegue a la presinapsis. Dicho potencial de acción abrirá los canales de calcio dependientes de voltaje, incrementando la concentración citosólica de calcio, incremento que activa los sensores de calcio y finalmente, dispara la exocitosis de neurotransmisores. Así, la pérdida de las proteínas Munc 13-1 y Munc 13-2 provoca la supresión total de la transmisión sináptica, tanto espontánea como inducida (Varoqueaux y cols., 2002). Además, las proteínas Munc 13 participan en los procesos de plasticidad sináptica como son la facilitación de la liberación de neurotransmisores inducida por ésteres de forbol (Rhee y cols., 2002) o por estimulación repetida (Rosenmund y cols., 2002), ya sea mediante el incremento de la población de vesículas competentes para la liberación o por el incremento de la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  de la fusión de éstas vesículas ya preparadas (Basu y cols., 2007).

Aunque todos los dominios reguladores de las proteínas Munc 13 modulan su actividad, la activación del dominio de unión de diacilglicerol es absolutamente imprescindible para su función, como demuestra el hecho de que los ratones que poseen una proteína Munc 13-1 que carece de dicho dominio mueran a las pocas horas de nacer (Rhee y cols., 2002; Varoqueaux y cols., 2002). Una de las fuentes principales de diacilglicerol es la hidrólisis de fosfoinosítidos mediada por fosfolipasa C. Por tanto, parece que la activación de esta enzima es necesaria para la función de Munc 13. Si bien la PLC puede activarse por el incremento de calcio intracelular asociado a la actividad sináptica, también puede ser activada por receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (Rebecchi y Pentylala, 2000). En este sentido, se ha descrito que receptores de histamina  $\text{H}_1$  potencian la exocitosis de neurotransmisores mediante una vía de señalización que implica la activación de PLC por proteínas  $\text{G}_q$  y que es dependiente de Munc 13-1 (Bauer y cols., 2007).

Atendiendo a las diferencias funcionales entre las distintas isoformas, se ha observado que las sinapsis donde la liberación de neurotransmisores está controlada exclusivamente por la isoforma Munc 13-1 tienden a experimentar un fenómeno de depresión durante una estimulación repetida mientras que aquellas sinapsis dependientes de Munc 13-2 experimentan una potenciación de la transmisión sináptica en estas mismas condiciones. No obstante, ambos tipos de sinapsis conservan la potenciación inducida por ésteres de forbol (Rosenmund y cols., 2002). En este sentido, se ha

descrito que las diferentes propiedades de las isoformas de Munc 13 podrían determinar las propiedades funcionales de una sinapsis en función de la/las isoformas que exprese (Breustedt y cols., 2010).

## **II. OBJETIVOS**

- 1.- Conocer la posible inhibición por mGluR7 de la actividad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q en terminaciones sinápticas y definir su mecanismo de señalización, así como su repercusión en la liberación de glutamato.
- 2.- Estudiar la posible asociación entre el subtipo de canal de calcio expresado en el botón sináptico y la oclusión de las respuestas inhibitoras de los receptores mGlu7, adenosina  $\text{A}_1$ , y  $\text{GABA}_\text{B}$ .
- 3.- Conocer las diferencias en las propiedades de liberación de glutamato de las terminaciones sinápticas que expresan canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N y las terminaciones sinápticas que expresan canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q.
- 4.- Determinar la capacidad de mGluR7 para potenciar la liberación de glutamato y definir el mecanismo de señalización de esta respuesta.
- 5.- Determinar si las respuestas potenciadoras de la liberación inducidas por mGluR7 y por ésteres de forbol comparten el mismo mecanismo de señalización.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. Materiales.

### 1.1. Animales.

Las preparaciones de terminales sinápticos (sinaptosomas) se obtuvieron a partir de ratas (*Rattus norvegicus*) Wistar macho adultas (2-3 meses, 150-200 gramos de peso), suministradas por los animalarios de las Facultades de Medicina tanto de la Universidad Autónoma como de la Universidad Complutense de Madrid.

En lo que respecta a los ratones, el doctor Yasuo Mori del Departamento de Fisiología del Instituto Nacional de las Ciencias Fisiológicas de Myodaiji (Okazaki, Japón), nos cedió parejas de ratones heterocigotos para el gen inactivado de la subunidad  $\alpha_{1B}$  de los canales de calcio de tipo N (ratones +/-), los ratones carentes de esta subunidad fueron generados por Ino y cols. en el 2001 a partir de ratones (*Mus musculus*) con un fondo genético C57BL/6. De este modo, mediante el cruce de estas parejas de heterocigotos, obtuvimos ratones homocigotos tanto para el gen normal de la subunidad  $\alpha_{1B}$  ( $\alpha_{1B}$  +/+) como para la deficiencia del mismo ( $\alpha_{1B}$  -/-). La edad de los ratones usados para nuestra preparación osciló entre 2 y 6 meses y, debido a la dificultad de la obtención de ratones  $\alpha_{1B}$  -/- en abundancia, fueron usados indistintamente ejemplares de ambos sexos.

Todos los procedimientos empleados en este trabajo tanto para el manejo como para el sacrificio de los animales fueron llevados a cabo de acuerdo con las directrices de la Comisión Europea (86/609/CEE) y fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense.

### 1.2. Reactivos, productos químicos y aparatos.

#### 1.2.1. Genotipado de los ratones.

El kit comercial Wizard SV Genomic DNA Purification System, la proteinasa K, la Taq polimerasa y la mezcla de nucleótidos se compraron a Promega Corporation (Madison, EE.UU.).

Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, Reino Unido) suministró los cebadores NP6, NP8 y AGN2.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se usó un termociclador modelo Mastercycler personal de Eppendorf (San Sebastián de los Reyes, Madrid, España).

La agarosa D-2 se compró a Laboratorios Conda (Madrid, España).

Para la tinción del gel de electroforesis se usó SYBR Safe (Invitrogen, San Diego, California, EE.UU.).

Real Durviz S. L. (Paterna, Valencia, España) suministró el marcador de peso molecular (rango 100-1250 pares de bases).

La electroforesis en geles de agarosa se realizó empleando el sistema Hoefer miniVe alimentado con una fuente modelo EPS 601 de Amersham Pharmacia (GE Healthcare, Reino Unido).

Para la toma de imágenes de los geles se empleó un analizador de imágenes Fluor S Multimager de Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hércules, California, EE.UU.).

### **1.2.2. Obtención de los sinaptosomas.**

La sacarosa fue suministrada por VWR International Ltd. Pool (Reino Unido).

De la casa Merck (Darmstadt, Alemania) se obtuvieron el ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA . 2H<sub>2</sub>O), el cloruro sódico, el cloruro potásico, el bicarbonato sódico, el dihidrógeno fosfato de sodio monohidratado, el cloruro magnésico hexahidratado, el hidróxido sódico, la D(+)glucosa y el ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetil sulfónico (HEPES).

Sigma-Aldrich (San Luis, E.E.U.U.) suministró el ditiotreitól (DL-DTT).

El percoll se compró a la empresa GE Healthcare (Reino Unido).

Para la homogeneización del tejido cerebral se utilizó un homogeneizador modelo Potter S suministrado por B. Braun (Melsungen, Alemania).

La formación de los gradientes de Percoll se llevó a cabo mediante la bomba peristáltica modelo PumpDrive 5201 de Heidolph (Kelheim, Alemania).

Las centrifugaciones se realizaron con la centrífuga preparativa refrigerada Sorvall modelo RC-5B con rotores Sorvall SS-34 y SM-24 (Thermo Scientific, Massachusetts, EE. UU.).

Para la retirada del sobrenadante se utilizó la bomba de succión Aspirator A-3S de Eyela (California, EE.UU.).

### 1.2.3. Determinación de proteínas.

#### 1.2.3.1. Método de Biuret.

La albúmina de suero bovino (BSA) fue suministrada por Sigma-Aldrich (San Luis, EE.UU.).

El tartrato de sodio y potasio se compró a Panreac (Barcelona, España).

Merck (Darmstadt, Alemania) proporcionó Triton X-100 y sulfato de cobre pentahidratado.

#### 1.2.3.2. Método de Bradford.

El kit comercial Bio-Rad Protein Assay se compró a Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hércules, California, EE.UU.).

Las medidas de absorbancia en ambos métodos de determinación de proteínas se realizaron mediante un espectrofotómetro Pharmacia Ultrospec III suministrado por Pegasus Scientific Inc. (Rockville, Maryland, EE. UU.).

### 1.2.4. Determinación de la liberación de glutamato.

La albúmina de suero bovino (BSA) libre de ácidos grasos, la enzima glutamato deshidrogenasa (E. C. 1.4.1.3.) y los compuestos NADP<sup>+</sup>, 4-aminopiridina (4-AP), ácido etilenglicol-bis ( $\beta$ -amino etil éter)-N, N, N', N'-tetraacético (EGTA), 4- $\beta$ -forbol-12, 13-dibutirato (4- $\beta$ -PDBu), 4- $\alpha$ -forbol-12, 13-dibutirato (4- $\alpha$ -PDD), toxina pertúsica (PTx), ciclohexiladenosina (CHA), L-ácido glutámico y dimetilsulfóxido (DMSO) fueron comprados a Sigma-Aldrich (San Luis, EE.UU.).

La enzima adenosina desaminasa (ADA) (E. C. 3.5.4.4.) y el inhibidor de proteínas quinasas estaurosporina fueron obtenidas de Roche Diagnostic S.L. (Barcelona).

Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido) suministró los agonistas ácido L-2-amino-4-fosfonobutírico (L-AP4), dihidrocloruro de N,N'-bis(difenilmetil)-1,2-etanodiamina (AMN 082) y ácido (R)-4-amino-3-(4-clorofenil)butanoico (baclofén), así como los antagonistas (RS)- $\alpha$ -ciclopropil-4-fosfonofenilglicina (CPPG), , ester de 7(hidroximino) ciclopropa[b]cromo-1a-carboxilato de etil (CPCCOEt), 2-metil-6(feniletinil) piridina (MPEP) y LY-341495.

De la casa Merck (Darmstadt, Alemania) se obtuvieron los siguientes reactivos: cloruro de calcio, cloruro de cadmio, toxina pertúsica (PTx) y los fármacos 1-[6-((17 $\beta$ -3-Metoxiestra-1, 3, 5(10)-trien-17-il)amino)hexil]-1H-pirrol-2, 5-diona (U-73122); 1-[6-((17 $\beta$ -3-Metoxiestra-1, 3, 5(10)-trien-17-il)amino)hexil]-1H-pirrolidin-2, 5-diona (U-73343); hidrocloreto de bisindolilmaleimide I; cloruro de calmidazolium; calfofina C; dihidrocloreto de N-(2-(p-Bromocinamilamino)etil)-5-isoquinolinsulfonamida (H-89); 9-(Tetrahidro-2'-furyl)adenina (SQ-22536); ionomicina y forskolina.

La forma permeable, éster acetoximetil, del ácido 1,2 bi-(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA-AM) se compró a Invitrogen (Frederick, Maryland, EE. UU.).

Las toxinas de canales de calcio  $\omega$ -conotoxina-GVIA y  $\omega$ -agatoxina-IVA fueron compradas a Peptide Institute INC. (Osaka, Japón).

La tetrodotoxina (TTx) fue suministrada por Alomone (Jerusalén, Israel).

El análogo de AMPc, isómero Sp de monofósforotioato de 8-bromoadenosina- 3', 5'- cíclica (Sp-8-Br-cAMPS) se compró a Biolog (Bremen, Alemania).

Tanto la determinación de la liberación de glutamato como la concentración de calcio intrasínaptosomal se realizaron mediante fluorímetros Perkin-Elmer LS-50B y LS-55 (Massachusetts, EE. UU.). El recipiente para la incubación de los sinaptosomas (1 hora a 37,4 °C) se introdujo en un baño termostatzado Digiterm 100 de JP Selecta (Abrera, Barcelona, España) manteniéndose una temperatura de 37,4°C durante todo el ensayo. Este recipiente está situado sobre un agitador magnético Agimatic-E (JP Selecta) que permite la agitación continua de la suspensión de sinaptosomas durante toda la incubación. La agitación de la suspensión de sinaptosomas, tanto en los tubos de incubación, como dentro de la cubeta del fluorímetro se llevó a cabo mediante pequeñas barras magnéticas agitadoras recubiertas de teflón (distribuidas por Nessler, Madrid, España). La cubeta de ensayo también se mantuvo a una temperatura constante durante todo el ensayo de 37,4 °C mediante su acoplamiento a un baño termostatzado Digiterm 100 de JP Selecta (Abrera, Barcelona, España).

Para los lavados de los sinaptosomas tras la incubación se usaron centrífugas para tubos Eppendorf modelo Biofuge pico de Heraeus (Hanau, Alemania).

### **1.2.5. Inmunocitoquímica.**

La poli-L-lisina fue suministrada por Biochrom AG (Berlín, Alemania).

Sigma-Aldrich (San Luis, EE.UU.) suministró el paraformaldehído.

El suero normal de cabra (NGS) se compró a Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, EE.UU.).

Tanto el suero policlonal de conejo (nº de catálogo 101 002) como el anticuerpo monoclonal de ratón (nº de catálogo 101 011) contra el marcador vesicular sinaptofisina 1, así como el anticuerpo monoclonal de ratón frente a munc 13-1 (nº de catálogo 126 111) y los anticuerpos policlonales de conejo contra munc 13-1 (nº de catálogo 126 103) y contra los transportadores de glutamato vGluT1 (nº de catálogo 135 302) y vGluT2 (nº de catálogo 135 402) se compraron a Synaptic Systems (Göttingen, Alemania).

El suero policlonal de cabra contra munc 13-2 (nº de catálogo sc-13634) se compró a Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, California, EE. UU.).

Los anticuerpos policlonales de cobaya contra mGluR7a, mGluR4a y mGluR8a así como el anticuerpo policlonal de ratón frente a mGluR7a fueron cedidos por el doctor Ruychi Shigemoto, del Instituto Nacional de las Ciencias Fisiológicas de Myodaiji (Okazaki, Japón) (Shigemoto y cols., 1997).

El anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con el fluorocromo derivado de cianina Cy2 y los anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo y de cabra anti-ratón conjugados con el fluorocromo Cy3 se compraron a Jackson (West Grove, Pensilvania, EE.UU.).

Chemicon International (Temecula, California, EE. UU.) suministró el anticuerpo secundario de burro anti-cobaya conjugado con el fluorocromo Cy3.

Invitrogen (Frederick, Maryland, EE. UU.) suministró el kit comercial Prolong Antifade para el montaje final de los cubreobjetos y los anticuerpos secundarios de burro anti-cabra, de cabra anti-conejo y de cabra anti-ratón conjugados con el fluorocromo Alexa 594; así como los anticuerpos secundarios de cabra anti-cobaya, de cabra anti-conejo y de cabra anti-ratón conjugados con el fluorocromo Alexa 488.

Los cubreobjetos y portaobjetos se compraron a Menzel-Gläser (Braunschweig, Alemania).

El tratamiento de los cubreobjetos con polilisina se realizó en una estufa Indigit de JP Selecta (Abrera, Barcelona, España) y el fijado de los

sinaptosomas en los cubreobjetos tuvo lugar sobre una placa termost atizada Plactronic (JP Selecta).

Los sinaptosomas fueron visualizados mediante un microscopio invertido Nikon Diaphot modelo TE200 equipado con un objetivo de inmersión Nikon 100X y una lámpara de mercurio de alta presión también Nikon (Tokio, Japón) modelo HB-10101AF. Para la adquisición de imágenes se utilizó una cámara CCD Hamamatsu modelo C4880 (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japón).

#### **1.2.6. Determinación de los niveles intras inaptosomales de AMPc.**

El inhibidor de fosfodiesterasas 3 -isobutil -1 -metilxantina (IBMX), y el hidroc loruro de trietanolamina fueron suministrados por Sigma-Aldrich (San Luis, E.E.U.U.).

Merck (Darmstadt, Alemania) proporcionó el ácido perclórico y el hidróxido de potasio.

El ensayo comercial (TRK 432) para la determinación de AMPc se compró a GE Healthcare (Reino Unido).

Las determinaciones radiométricas se realizaron con un contador de centelleo Beckman (Beckman Instruments, E.E.U.U.) modelo LS 3801. El líquido de centelleo también se compró a Beckman.

#### **1.2.7. Determinación de la concentración citosólica de calcio libre ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>cit</sub>).**

La forma permeable, éster acetoximetil, de la sonda fluorescente Fura 2 (Fura 2-AM) fue suministrada por Invitrogen (Frederick, Maryland, EE. UU.).

Merck (Darmstadt, Alemania) suministró el dodecilsulfato sódico (SDS) y el Tris(hidroximetil)-aminometano (Tris).

### **1.2.8. Cuantificación de segundos mensajeros mediante Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia (FRET).**

#### **1.2.8.1. Determinación de la acumulación intrasinaptosomal de inositol monofosfato (IP<sub>1</sub>).**

Como inhibidor de la enzima inositol monofosfatasa se usó cloruro de litio (Merck, Darmstadt, Alemania).

Cisbio Bioassays (Bagnol sur-Cèze, Francia) suministró el kit comercial IP-One para la determinación de la acumulación de IP<sub>1</sub>.

Para la cuantificación de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) se usaron los lectores de placas modelo RubyStar y FluoStar suministrados por BMG Labtechnologies (Offenburg, Alemania).

#### **1.2.8.2. Determinación de los niveles intrasinaptosomales de AMPc.**

Como inhibidor de fosfodiesterasas se utilizó Ro-20-1724 suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania).

CisBio Bioassays (Bagnol sur-Cèze, Francia) suministró el kit comercial cAMP Dynamic para la determinación de AMPc.

Para la cuantificación de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) se usó un lector de placas modelo RubyStar (BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania).

### **1.2.9. Cuantificación de la translocación de la proteína munc13-1.**

#### **1.2.9.1. Aislamiento de las fracciones soluble y particulada.**

De ThermoScientific Inc. (Rockford, Illinois, EE.UU.) se obtuvo el kit comercial para la inhibición de proteasas.

Para la agitación durante el periodo de choque hiposmótico y la incubación con los anticuerpos se usó el agitador Gyrotwister de Labnet (Madrid, España).

Sigma Aldrich (San Luis, EE. UU.) suministró el 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS).

### 1.2.9.2. Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa y acetilcolinesterasa de las fracciones soluble y particulada.

El yoduro de acetiltiocolina, 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico) (reactivo de Ellman), la forma reducida de nicotinamina adenina dinucleótido (NADH) y el piruvato sódico se compraron a Sigma Aldrich (San Luis, EE. UU.).

### 1.2.9.3. Inmunotransferencia (*western blotting*).

Sigma Aldrich (San Luis, EE. UU.) suministró polietilen glicol sorbitan monolaurato (Tween 20) glicerol y el anticuerpo monoclonal de ratón contra  $\beta$ -tubulina (nº de catálogo T0198).

Bio-Rad (Alcobendas, Madrid, España) suministró todo el material necesario para la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS): acrilamida (proporción 30% acrilamida/bisacrilamida), dodecilsulfato sódico (SDS), tris(hidroximetil)-aminometano (Tris), N,N,N,N'-tetrametilnediamina (TEMED), persulfato amónico, azul de bromofenol, glicina,  $\beta$ -mercaptoetanol, así como el equipo Mini Protean Tetrasystem empleado tanto para la electroforesis como para la inmunotransferencia.

El metanol se compró a Panreac (Barcelona, España).

Las membranas de nitrocelulosa fueron suministradas por GE Healthcare (Reino Unido).

Synaptic Systems (Göttingen, Alemania) proporcionó el anticuerpo monoclonal de ratón frente a munc 13-1 (nº de catálogo 126 111), así como los anticuerpos policlonales de conejo contra munc 13-1 (nº de catálogo 126 103) y contra el transportador de glutamato VGLUT1 (135 302).

El anticuerpo policlonal de conejo frente a subunidad  $\beta_1$  de la ATPasa de sodio/potasio (nº de catálogo 06-170) se compró a Upstate-Millipore (Molsheim, Francia).

Tanto el tampón de bloqueo como los anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón y anti-conejo conjugados con las sondas infrarrojas de 680 nm y 800 nm respectivamente se compraron a Rockland Immunocitochemicals (Gilbertsville, Pensilvania, EE. UU.).

La visualización, adquisición de imágenes y cuantificación de las bandas inmunorreactivas se llevaron a cabo mediante el sistema Odyssey (LI-COR, Lincoln, Nebraska, EE. UU.).



### **1.2.10. Experimentos de coimmunoprecipitación.**

La homogeneización de los sinaptosomas se realizó mediante el homogeneizador modelo VDI 12 (VWR International, Barcelona, España).

De Sigma-Aldrich (San Luis, EE. UU.) se obtuvieron el desoxicolato sódico y las esferas de proteína A agarosa.

El doctor Ruychi Shigemoto, del Instituto Nacional de las Ciencias Fisiológicas de Myodaiji (Okazaki, Japón) (Shigemoto y cols., 1997) facilitó el suero policlonal de conejo frente a mGluR7a.

Tanto el kit comercial Re-Blot Plus Strong, para liberar la membrana de anticuerpos, como el suero policlonal de conejo frente a mGluR7 (nº de catálogo 07-239) se compraron a Millipore (Molsheim, Francia).

Los anticuerpos monoclonales de ratón (nº de catálogo 126 111) y policlonales de conejo contra munc 13-1 (nº de catálogo 126 103) se compraron a Synaptic Systems (Göttingen, Alemania).

Los sueros no inmunizados de conejo y de ratón se compraron a Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, California, EE. UU.).

El kit comercial TrueBlot que contiene tanto el esferas de inmunoprecipitación como el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) se compró a la casa eBioscience (San Diego, California, EE. UU.).

La membranas de difluoruro de polivideno (PVDF) fueron proporcionadas por GE Healthcare (Reino Unido).

Las bandas inmunorreactivas fueron detectadas por el método de Pierce mediante el kit Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate de ThermoScientific Inc. (Rockford, Illinois, EE.UU.) y la adquisición de imágenes se llevó a cabo mediante el sistema de imagen LAS-3000 (Fujifilm Life Science, Woodbridge, Connecticut, EE. UU.).

## 2. Métodos.

### 2.1. Genotipado de los ratones.

El genotipado de los ratones se hizo a partir de fragmentos de 0,5-2 cm. del extremo de la cola de los que se purificó el ADN mediante un kit comercial (Wizard SV Genomic DNA Purification System).

La secuencia del gen de la subunidad  $\alpha_{1B}$  se amplificó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con los oligonucleótidos cebadores NP6 (5'-TGGCACCTTATGCCTTGCACGGTGCCTGCG-3'), NP8 (5'-GGTCGAGATGGCTTGC GGGACCCGTTGGGA-3') y AGN2 (5'-GCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAAT-3') correspondientes a la secuencias de nucleótidos del bucle que une las regiones transmembrana II y III de la subunidad  $\alpha_{1B}$  y al promotor de fosfoglicerol quinasa unido al gen de resistencia a neomicina (insertados en el gen normal de la subunidad  $\alpha_{1B}$  para inactivar de este modo su transcripción) (Ino y cols., 2001). Esta reacción se realizó en un termociclador tal y como se describe en el siguiente esquema:

5 min., 94°C	30 ciclos	7 min., 72°C
Activación	1 min, 94 °C desnaturalización 1 min, 62°C hibridación 1 min, 72°C elongación	Elongación

Este ADN amplificado fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa a 2%; que fue teñido con SYBR Safe y visualizado mediante un analizador de imágenes Fluor S de Bio-Rad.



**Figura III.1. Análisis del genotipo de los ratones.**

Imagen de un gel de agarosa tras la electroforesis de las muestras de ADN amplificadas por PCR de ratones  $\alpha_{1B}$  (+/+),  $\alpha_{1B}$  (+/-) y  $\alpha_{1B}$  (-/-). Se pueden observar dos bandas de distinto tamaño en los animales heterocigotos; siendo la más grande (600 pares de bases) la correspondiente al gen de  $\alpha_{1B}$  con el inserto ya mencionado y la más pequeña (500 pares de bases) la que corresponde al gen sin modificar. Observándose sólo la banda más de mayor tamaño en el ADN de animales homocigotos para el gen inactivado de la subunidad  $\alpha_{1B}$  y sólo la banda de 500 p. b. en los ratones de tipo silvestre (*wild type*).

## 2.2. El sinaptosoma como modelo de presinapsis *in vitro*.

En el estudio de los mecanismos presinápticos de la transmisión glutamatérgica se han utilizado diferentes preparaciones, como rodajas de tejido cerebral, neuronas en cultivo, oocitos de *Xenopus* o líneas celulares transfectadas, sinaptoneurosomas y sinaptosomas. Cada una de estas preparaciones presenta ventajas e inconvenientes, y la elección de una u otra debe realizarse en función del aspecto que se desee estudiar.

La expresión de receptores recombinantes en líneas celulares constituye un buen modelo para analizar aspectos funcionales e identificar las respuestas asociadas a la activación de un determinado receptor. Asimismo, posibilitan el estudio de la relación estructura-función, permitiendo por ejemplo el análisis de los efectos de la pérdida de una secuencia del receptor o la identificación de residuos clave en su funcionalidad. Sin embargo, estos sistemas podrían carecer de alguno de los elementos de las vías de transducción de los sistemas nativos, por lo que su utilidad en determinados estudios es limitada.

Las rodajas de tejido cerebral, por su parte, presentan la ventaja de que pueden ser estimulados eléctricamente en sinapsis localizadas. Sin

embargo, salvo en algunos tipos de sinapsis concretas, como es el caso del cáliz de Held (Borst y cols., 1995; Takahashi y cols., 1996), o de las células bipolares de la retina del pez dorado (Tachibana y Okada, 1991), en las que el gran tamaño del elemento presináptico permite la estimulación de una única terminación nerviosa, las respuestas registradas en la célula postsináptica son el resultado de la estimulación de numerosas terminaciones sinápticas, no permitiendo el análisis de respuestas individuales.

El término *sinaptosoma* hace referencia a los botones presinápticos obtenidos tras el resellado espontáneo de la membrana plasmática durante la homogeneización del tejido cerebral. Frente a los sinaptoneurosomas, que conservan las membranas postsinápticas reselladas, los sinaptosomas son un modelo útil para la investigación de fenómenos presinápticos, ya que las interferencias postsinápticas quedan minimizadas, permitiendo el análisis de los efectos y vías de transducción de señales que median los distintos receptores presinápticos. Además, los sinaptosomas exhiben una alta capacidad de transporte de glutamato, manteniendo una concentración de glutamato extracelular relativamente baja y cercana a los valores fisiológicos (1  $\mu\text{M}$ ) (Lerma y cols., 1986), lo que limita considerablemente la posibilidad de desensibilización de los receptores.

Una de las ventajas de la preparación de sinaptosomas es que posibilita el análisis de respuestas individuales mediante técnicas de imagen de  $\text{Ca}^{2+}$ , permitiendo, por ejemplo, estudiar la distribución de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje en terminaciones individuales (Millán y cols., 2002b), determinar el porcentaje de botones sinápticos que presentan un determinado receptor (Millán y cols., 2002a), así como, analizar diversas respuestas en un mismo botón individual para conocer la subpoblación de terminaciones sinápticas en las que coexisten un tipo de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  y un receptor determinado (Millán y cols., 2003; Godino y cols., 2007) o analizar la coexistencia de varios receptores en un mismo botón (Ladera y cols., 2007).

El sinaptosoma *in situ* puede operar de forma autónoma, salvo en lo que se refiere al recambio de proteínas y componentes de la membrana, representando el sistema más sencillo capaz de llevar a cabo la captación, síntesis, almacenamiento y exocitosis de neurotransmisores (Nicholls, 1989). Al microscopio electrónico los sinaptosomas aparecen como sacos citoplásmicos esféricos, de un diámetro de entre 0,5 y 1,5  $\mu\text{m}$ , conteniendo una o más mitocondrias y gran cantidad de vesículas sinápticas pequeñas, de en torno a 50 nm de diámetro, junto con ocasionales vesículas grandes de núcleo denso (Dunkley y cols., 1986) (fig. III. 2).

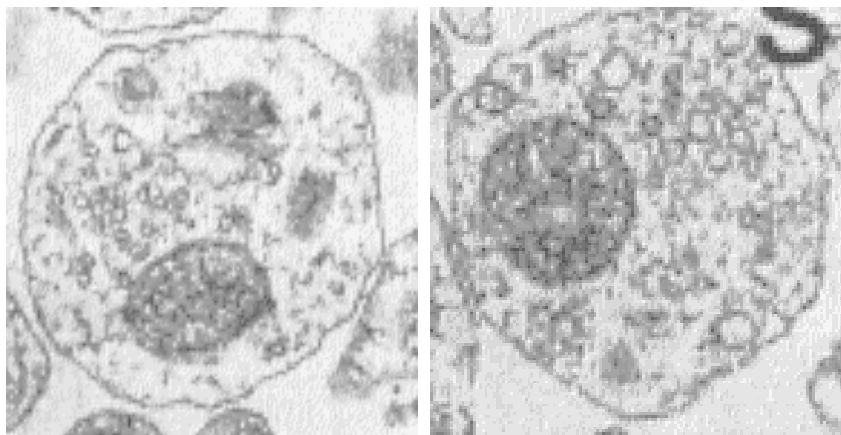


Figura III.2. Micrografías electrónicas de sinaptosomas (adaptadas de Dunkley y cols., 1986).

Los sinaptosomas son autónomos desde el punto de vista bioenergético, y poseen la dotación enzimática y proteica necesaria para llevar a cabo la síntesis de neurotransmisores y su almacenamiento en vesículas. Cuando se incuban en un medio rico en iones  $\text{Na}^+$  (120 mM) y bajo en iones  $\text{K}^+$  (3,5 mM), y con un aporte complementario de glucosa (10 mM), los sinaptosomas respiran activamente, manteniendo una producción elevada de ATP y fosfocreatina y una velocidad constante de respiración durante varias horas (Kauppinen y Nicholls, 1986). Los sinaptosomas contienen mitocondrias funcionales, estando la síntesis de ATP restringida a la glucólisis aeróbica. Cuando la síntesis mitocondrial de ATP es inhibida por la anoxia, se pone en marcha la glucólisis anaerobia hacia lactato, incrementándose hasta 10 veces el consumo de glucosa, sin cambios significativos en los niveles de ATP, que sólo disminuyen muy levemente (Kauppinen y Nicholls, 1986).

La membrana plasmática de los sinaptosomas presenta una conductancia elevada para el  $\text{K}^+$  y baja para el  $\text{Na}^+$ , por lo que el potencial de membrana resultante oscila entre  $-60$  y  $-80$  mV. En los terminales sinápticos se ha descrito la presencia de un canal de  $\text{K}^+$ , denominado  $\text{I}_A$ , que participa en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo, activándose rápidamente cuando la membrana se despolariza ligeramente, restableciendo de esta forma el potencial de membrana (Castle y cols., 1989). El bloqueo de este canal por 4-aminopiridina (4-AP) desestabiliza el potencial de membrana, desencadenando potenciales de acción espontáneos (Tibbs y cols., 1989; Tibbs y cols., 1996). 4-AP también actúa sobre canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje de tipo  $\text{I}_D$ , así como sobre canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$ , que se activan en la fase final de los potenciales de acción, restableciendo el potencial de membrana en reposo (Blaustein y cols., 1988).

Los sinaptosomas mantienen una baja concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (50-200 nM), incluso en medios con alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM). Esto es debido al transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a las mitocondrias y a la salida del ión a través de la membrana plasmática mediante el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y la ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . El intercambiador utiliza el gradiente de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana, traslocando tres iones de  $\text{Na}^+$  por uno de  $\text{Ca}^{2+}$ , y se activa alostéricamente por  $\text{Ca}^{2+}$  interno. El carácter electrogénico de este transportador ha llevado a sugerir su posible contribución en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la despolarización de los terminales, aunque la ausencia de bloqueantes específicos ha impedido establecer de manera inequívoca su participación. La ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  bombea un ión por cada molécula de ATP hidrolizada, y podría representar el principal mecanismo de extracción de  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma (Snelling y Nichols, 1985).

El sinaptosoma posee toda la maquinaria bioquímica necesaria para acoplar la despolarización de la membrana plasmática a la entrada de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y a la liberación de neurotransmisores. Además de la exocitosis vesicular de glutamato, la despolarización también induce una liberación independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y de ATP, que es debida a la reversión de los transportadores de glutamato acoplados al gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$ . La liberación independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  se ve incrementada en condiciones de privación de energía, debido a que el declive del gradiente de  $\text{Na}^+$  favorece la reversión del transportador. Se ha sugerido que esta liberación de glutamato citosólico podría contribuir a la toxicidad producida por este neurotransmisor en condiciones de anoxia e isquemia cerebrales, ya que la reducción de los niveles de ATP bloquea la exocitosis e incrementa la salida de glutamato citosólico (Rubio y cols., 1991). Esta acumulación de glutamato en el espacio sináptico provocaría una sobreestimulación de los receptores postsinápticos, especialmente del subtipo NMDA, con el consiguiente daño neuronal.

### **2.2.1. Obtención de los sinaptosomas.**

Los sinaptosomas se purificaron en un gradiente discontinuo de Percoll según la técnica descrita por Dunkley y colaboradores (1986) y Wang y colaboradores (1989). Las ratas o los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y decapitación. Una vez extraído el cerebro se lavó en sacarosa 0,32 M a pH 7,4 y 4°C, y se realizó la disección de la corteza cerebral, el hipocampo o el cerebelo para homogeneizarlos a 700 r.p.m., realizándose 7 pases completos, en un homogeneizador modelo Potter con vástago de teflón. El homogeneizado resultante se centrifugó a 2.000 g durante 2 minutos a 4°C, recogiendo el

sobrenadante (S<sub>1</sub>). Para aumentar el rendimiento, el sedimento se resuspendió de nuevo en sacarosa 0,32 M y se volvió a centrifugar a 2000 g durante 2 minutos. Ambos sobrenadantes se centrifugaron a 9.500 g durante 12 minutos a 4 °C. El sedimento resultante (P<sub>2</sub>) se resuspendió en 8 ml de sacarosa 0,32 M. Esta suspensión se colocó sobre un gradiente discontinuo de Percoll, preparado en un medio compuesto por sacarosa 0,32 M, EDTA 1 mM y DTT 0,25 mM, y formado por bandas de 3 ml de Percoll al 3 %, 10 % y 23 %, a pH 7,4. Los gradientes se centrifugaron a 25.000 g durante 10 minutos a 4°C para, a continuación, recoger los sinaptosomas en la interfase formada por las bandas de Percoll al 10 % y al 23 %. La mielina quedó en la banda de Percoll al 3 %, mientras que las mitocondrias sedimentaron en el fondo del tubo. Los sinaptosomas se diluyeron hasta un volumen final de 30 ml con medio HBM (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, glucosa 10 mM y HEPES 10 mM; pH 7,4), y fueron centrifugados a 22.000 g durante 10 minutos a 4°C. El sedimento (P<sub>3</sub>) resultante se resuspendió en 8 ml de medio HBM, determinándose a continuación el contenido de proteínas por el método de Biuret. Las alícuotas con 0,75 mg (para los ensayos de liberación de glutamato), 2 mg (para la medida de [Ca<sup>2+</sup>] intra sinaptosomal) o 1 mg (para la determinación de segundos mensajeros mediante FRET) de la suspensión de sinaptosomas se diluyeron con medio HBM hasta 10 ml y se centrifugaron a 3.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y los sinaptosomas, sedimentados en el fondo del tubo, se conservaron en un baño de hielo (fig. III. 3).

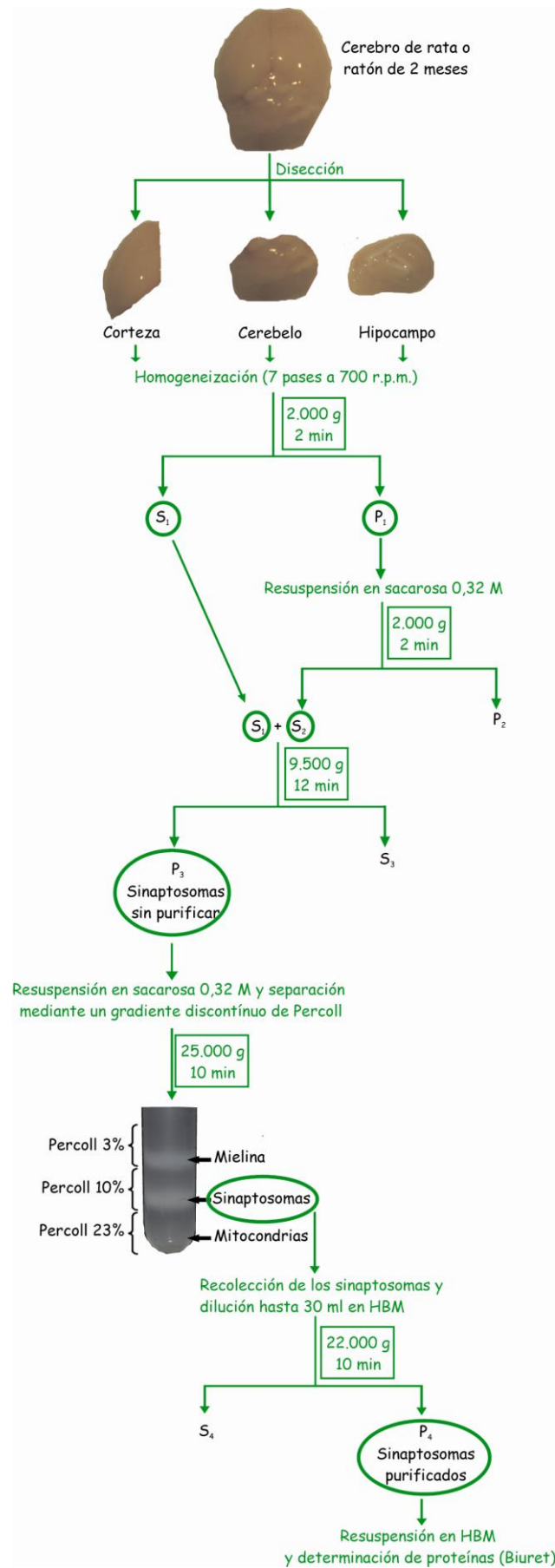


Figura III.3. Esquema del procedimiento seguido en la obtención de sinaptosomas.



### 2.2.2. Determinación de proteínas (método de Biuret).

La determinación del contenido de proteínas se realizó según el método de Biuret, descrito por Gornall y cols. (1949) basado en la formación de un complejo, de color azul, entre los enlaces peptídicos y el ión  $\text{Cu}^{2+}$ .

La composición del reactivo de Biuret es la siguiente:

Sulfato de cobre	1,6 % (p/v)
Tartrato de sodio y potasio	6,0 % (p/v)
Hidróxido de sodio	3,0 % (p/v)

Como proteína patrón se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 10 mg/ml, según se indica a continuación:

	<b>Tubo 1 (blanco)</b>	<b>Tubo 2 (patrón)</b>	<b>Tubo 3 (sinaptosomas)</b>
<b>Tritón X-100 10%</b>	200	200	200
<b>H<sub>2</sub>O</b>	600	520	520
<b>Biuret</b>	1200	1200	1200
<b>BSA</b>	-	80	-
<b>Sinaptosomas</b>	-	-	80

**Tabla III. 1.** Todos los volúmenes están expresados en  $\mu\text{l}$ .

Los tubos se agitaron vigorosamente, determinándose a continuación su absorbancia a 550 nm mediante un espectrofotómetro.

La concentración de proteínas, expresada en mg/ml, se determinó por comparación de las absorbancias de la muestra con la de la solución patrón que contenía una cantidad de proteína conocida.

## 2.3. Ensayos de liberación de glutamato.

### 2.3.1. Inducción de la liberación de glutamato mediante despolarización de los sinaptosomas con KCl.

La principal diferencia entre un terminal sináptico *in situ* y un sinaptosoma es que éste último no puede recibir potenciales de acción a través de su axón. Además, el pequeño tamaño de la mayoría de los botones sinápticos impide la aplicación de electrodos, por lo que es necesario recurrir a procedimientos bioquímicos para inducir su despolarización.

En sinaptosomas polarizados la conductancia dominante es la de  $K^+$  (Schmalzing, 1985) y la membrana se despolariza cuando se incrementa la concentración extracelular de este ión (Scott y Nicholls, 1980), con la consiguiente apertura de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje y la inducción de la liberación de neurotransmisores (Tibbs y cols., 1989).

#### - Despolarización mediante altas concentraciones de KCl (30 mM):

La despolarización sostenida inducida por altas concentraciones de  $K^+$  (30 mM) es una técnica ampliamente utilizada en estudios de liberación, aunque presenta algunas limitaciones. La más importante es que no se observan acciones moduladoras que tengan su diana en canales que se inactivan rápidamente, como los canales de  $Na^+$  y  $K^+$  dependientes de voltaje, de tal manera que, aunque estos canales se activan inicialmente, se inactivan a continuación, permaneciendo en este estado durante todo el periodo de estimulación con  $K^+$ , no contribuyendo, por tanto, de manera significativa al proceso de liberación. La liberación de glutamato inducida por KCl 30 mM es, por tanto, resistente a los bloqueantes de canales de sodio y de potasio, tetrodotoxina y tetraetilamonio, respectivamente (Godino y cols., 2007). La despolarización con KCl sí permite, por el contrario, estudiar de manera eficaz aquellas modulaciones de la liberación que tienen su diana en canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje.

La utilidad del KCl como inductor de la despolarización en sinaptosomas de corteza cerebral ha sido corroborada por numerosos estudios de liberación de glutamato, en los que se han determinado las acciones moduladoras de distintos receptores presinápticos sobre canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje. Sirvan como ejemplo los estudios de inhibición de la liberación de glutamato por el receptor metabotrópico de glutamato del grupo

III, mGlu7 (Millán y cols., 2002a, 2002b y 2003), por el receptor de cannabinoides CB1 (Godino y cols., 2005 y 2007) así como por la acción conjunta de los receptores mGlu7, GABA<sub>B</sub> y adenosina A<sub>1</sub> (Ladera y cols., 2007). En cambio, aquellos mecanismos de modulación presináptica que afectan a canales de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> dependientes de voltaje, y por tanto a los potenciales de acción o a la excitabilidad presináptica no pueden ser estudiados bajo el régimen de despolarización inducido por K<sup>+</sup>.

Otro inconveniente de la despolarización con K<sup>+</sup> es que la despolarización prolongada que induce produce una reversión de los transportadores de glutamato dependientes de Na<sup>+</sup> de la membrana plasmática, dada su naturaleza electrogénica, con el consiguiente flujo de aminoácidos citosólicos al medio extracelular, liberación que debe ser cuidadosamente distinguida de la exocitosis.

#### **-Despolarización inducida con bajas concentraciones de KCl (5-10 mM):**

A diferencia del método de despolarización anterior, en la liberación de glutamato inducida por bajas concentraciones de KCl sí participan los canales de sodio y de potasio, por tanto, esta liberación sí es sensible al bloqueo de estos canales mediante tetrodotoxina y tetraetilamonio (Godino y cols., 2007). De este modo, este método de despolarización permite el estudio de modulaciones de la liberación de glutamato dependientes de estos canales como, por ejemplo, la inhibición de la liberación de glutamato que ejerce el receptor GABA<sub>B</sub> mediante la activación de los canales rectificadores de la corriente de potasio, GIRK (Ladera y cols., 2008).

#### **2.3.2. Inducción de la liberación de glutamato mediante despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina.**

La 4-aminopiridina (4-AP) bloquea algunos de los canales de K<sup>+</sup> que controlan la excitabilidad del terminal nervioso y las posibles fluctuaciones del potencial de membrana (Thesleff, 1980). Estos canales podrían actuar como estabilizadores del potencial de reposo, ya que su apertura en respuesta a despolarizaciones submáximas permite una rápida repolarización de la membrana, amortiguando así las pequeñas despolarizaciones producidas por la apertura espontánea de canales de Na<sup>+</sup>. El bloqueo de estos canales con

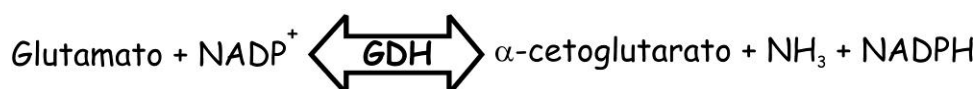
dendrotoxina (nM) o con 4-AP (mM) induce por tanto un potencial de membrana inestable, que posibilita la génesis espontánea de potenciales de acción, con la consiguiente apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje y la exocitosis de neurotransmisores (Tibbs y cols., 1989, 1996).

La 4-AP produce una despolarización más fisiológica que KCl, ya que en ella participan canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje, además de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por tanto, 4-AP es un estímulo adecuado para el estudio de aquellas modulaciones que implican un cambio en la excitabilidad presináptica o en las propiedades de los potenciales de acción. Además, el carácter transitorio de las despolarizaciones inducidas por 4-AP se traduce en una menor liberación de neurotransmisor citosólico por reversión del transportador de membrana. (Tibbs y col., 1989).

El diferente mecanismo de despolarización de KCl y 4-AP permite hacer un primer análisis del mecanismo modulador implicado en el efecto objeto del estudio, ya que aquellas modulaciones que sean observadas únicamente con 4-AP podrán ser debidas a una acción sobre canales de  $\text{Na}^+$  o de  $\text{K}^+$ , mientras que las observadas en presencia de ambos agentes despolarizantes implican una modulación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje o un efecto sobre la maquinaria exocitótica.

### 2.3.3. Determinación de la liberación de glutamato.

El glutamato liberado por estimulación de los sinaptosomas se determinó según la técnica descrita por Nicholls y cols. (1987), midiendo el incremento en la fluorescencia producido al generarse NADPH en la reacción catalizada por el enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) en presencia de  $\text{NADP}^+$ :



Las variaciones de fluorescencia se registraron a unas longitudes de onda de emisión y de excitación de 340 nm y 460 nm, respectivamente, y las rendijas de excitación y de emisión se fijaron en 15 nm y 20 nm.

Los sinaptosomas se resuspendieron (0,67 mg/ml) en un medio HBM ( $\text{NaCl}$  140 mM,  $\text{KCl}$  5mM,  $\text{NaHCO}_3$  5mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,2mM,  $\text{MgCl}_2$  1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; pH 7,4), siempre en presencia de BSA 16 $\mu$ M libre de ácidos grasos, y se incubaron a 37°C durante 1 hora en un baño con

agitación continua. Durante este periodo de incubación se realizaron los tratamientos con los diversos fármacos indicados en las leyendas de las figuras correspondientes así como los pretratamientos con los agonistas L-AP4 y baclofén en aquellos ensayos donde se cuantificó la facilitación de la liberación de glutamato inducida por estos agonistas, además en este último tipo de ensayos, tras la incubación de una hora, los agonistas se eliminaron mediante centrifugación (13700 g, 1 minuto) y resuspensión de los sinaptosomas (de nuevo en HBM más BSA 16 $\mu$ M libre de ácidos grasos).

Después de la incubación, 1 ml de la suspensión fue transferido a una cubeta de fluorímetro Perkin-Elmer LS-50, que contenía NADP<sup>+</sup> 1mM y CaCl<sub>2</sub> 1,33mM o una mezcla de Ca<sup>2+</sup>/EGTA (CaCl<sub>2</sub> 38 $\mu$ M y EGTA 50 $\mu$ M). En este último caso la concentración de calcio libre resultante es de alrededor de 200 nM.

El ensayo se inició con la adición de 50 unidades de actividad de glutamato deshidrogenasa, observándose un incremento en la fluorescencia debido a la presencia de glutamato extrasinaptosomal. La liberación de glutamato inducida por la despolarización se determinó mediante la adición de KCl, o bien del activador de adenilato ciclasa, forskolina o del ionóforo de Ca<sup>2+</sup>, inomicina registrándose la señal fluorescente cada segundo a lo largo de aproximadamente cinco minutos en agitación continua y a temperatura constante (37,4 °C).

Dado que la reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa es reversible, no existe linealidad entre el incremento de fluorescencia y la cantidad de glutamato liberada, por ello, al final de cada ensayo se añadió un patrón de 2 nmoles de glutamato para cuantificar el glutamato liberado.

Como se ha mencionado anteriormente, la despolarización de los sinaptosomas provoca también la salida de glutamato citosólico no vesicular, debido a la reversión de los transportadores de la membrana plasmática, por un mecanismo que es independiente de calcio. La liberación de glutamato dependiente de Ca<sup>2+</sup> (liberación vesicular) (registro negro) se calculó, por tanto, como la diferencia entre la liberación obtenida en presencia de 1,33 mM de Ca<sup>2+</sup> extracelular (registro rojo) y la liberación registrada en presencia de una concentración de calcio de 200nM (registro azul), insuficiente para inducir exocitosis (Fig. III. 2). En otros casos, la liberación de glutamato se indujo con el ionóforo de calcio, inomicina, que se inserta en la membrana plasmática formando poros por los que el calcio extracelular alcanza la maquinaria exocitótica provocando así una liberación independiente de la actividad de los

canales de calcio (Jovanovic y cols., 2000). En estos experimentos, la liberación de glutamato se calculó simplemente como la diferencia entre la liberación observada en presencia del ionóforo y la liberación basal obtenida en ausencia de éste.

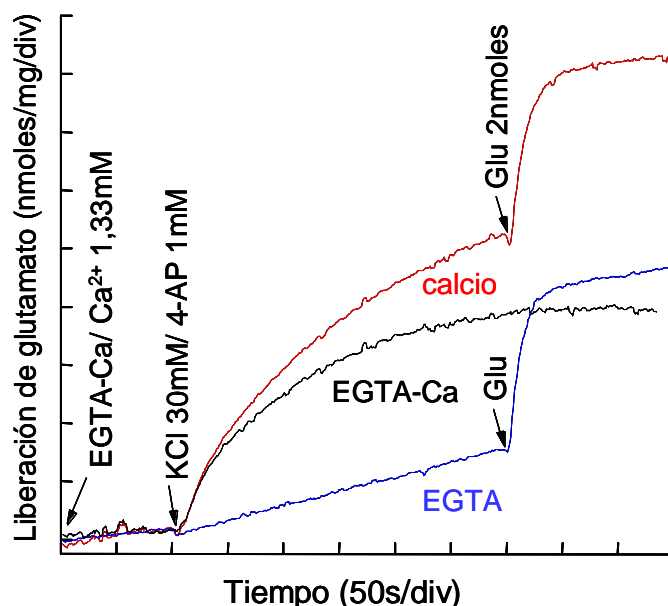


Figura III. 4. Cálculo de la liberación de glutamato dependiente de calcio.

## 2.4. Inmunocitoquímica.

Los sinaptosomas se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) libre de ácidos grasos, a 37°C, y se adhirieron durante 1 hora sobre un cubreobjetos tratado con polilisina después de diluir hasta 0,16 mg/ml de proteína.

A continuación, fueron fijados durante 4 minutos con paraformaldehído 4 % diluido en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) y, tras dos lavados de 5 minutos con tampón fosfato y un lavado de 10 minutos con una solución de Tris 50mM (pH 7,4) y cloruro sódico 0,9 % (TBS), se incubaron durante otra hora con una solución bloqueante de suero normal de cabra al 10 % (NGS) diluida en TBS y Triton X-100 al 0,2 %.

Tras este periodo, los sinaptosomas se incubaron durante 12 horas a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente: policlonaes de cobaya frente a mGluR7a, mGluR4a y mGluR8 (1:1000); policlonaes de conejo contra mGluR7a (1:400) y sinaptofisina 1 (1:100); monoclonal de ratón frente a munc 13-1 (1:500) y policlonal de cabra anti-munc 13-2 (1:150). Todos ellos diluidos en TBS, con NGS al 1 % y Triton X-100 al 0,2 %.

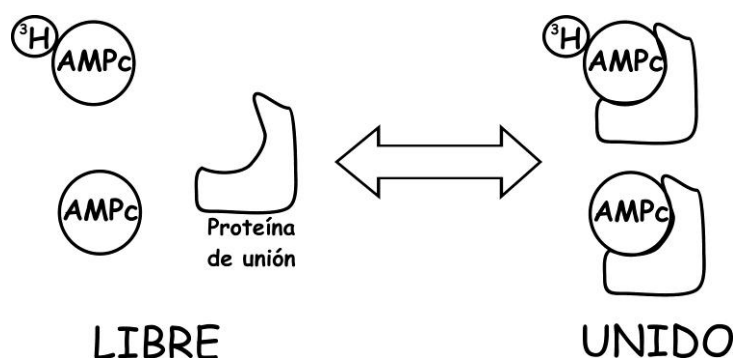
Tras tres lavados de 10 minutos con TBS, los terminales sinápticos fueron incubados durante otras 2 horas con los correspondientes anticuerpos secundarios: de cabra anti-conejo conjugado con el fluorocromo derivado de cianina Cy2 (1:200); de cabra anti-conejo y anti-ratón (1:200) y de burro anti-cobaya (1:400) conjugados con el fluorocromo Cy3; de burro anti-cabra, de cabra anti-conejo y de cabra anti-ratón conjugados con el fluorocromo Alexa 594 (1:500); así como los anticuerpos secundarios de cabra anti-cobaya, de cabra anti-conejo y de cabra anti-ratón conjugados con el fluorocromo Alexa 488 (1:500) fueron diluidos en TBS.

Después de tres lavados de 10 minutos con TBS los sinaptosomas fueron transferidos a un microscopio Nikon y visualizados mediante la luz proveniente de una lámpara de mercurio a través de un objetivo de 100 aumentos, empleando un filtro para rodamina tanto en el caso de Cy3 como de Alexa 594, y un filtro para fluoresceína en el caso de Cy2 y de Alexa 488. Para verificar la especificidad de la reacción inmunocitoquímica se realizaron controles en ausencia de anticuerpos primarios.

El tratamiento y análisis de las imágenes se realizó mediante el programa informático Image J, asignando el color rojo a la imagen tomada con filtro para rodamina y el color verde a la imagen adquirida con filtro para fluoresceína.

## 2.5. Determinación de los niveles intrasinaptosomales de AMPc.

Para determinar los niveles intrasinaptosomales de AMPc se utilizó el ensayo comercial de Amersham (TRK 432), que se basa en la competición entre AMPc frío y una cantidad fija de AMPc tritiado por la unión a una proteína con alta afinidad y especificidad por AMPc. La cantidad de complejo  $[^3\text{H}]\text{AMPc}$ -proteína que se forma estará, por tanto, inversamente relacionada con la cantidad de AMPc presente en la muestra. Así, la medida del AMPc radiactivo unido a la proteína permite estimar la cantidad de AMPc no marcado en la muestra:



Los sinaptosomas se resuspendieron (2 mg/ml) en un medio HBM sin BSA y se incubaron en un baño termostatzado a 37°C en agitación permanente. A los 5 minutos se añadió cloruro de calcio (1,33mM), adenosina desaminasa (1 U/mg de proteína) y el inhibidor de fosfodiesterasas 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (1mM). La incubación se mantuvo durante 25 minutos más, a lo largo de los cuales se fueron realizando las aplicaciones de los distintos agentes, dependiendo del experimento a realizar.

Una vez transcurridos 30 minutos se procedió a la recogida de 0,5 ml de cada muestra, a los que se añadió una solución que contenía ácido perclórico (1M) y EDTA (50mM) para precipitar las proteínas, agitándose de forma vigorosa. Las alícuotas se mantuvieron en hielo durante 20 minutos, tras los cuales se centrifugaron a 13.700 g durante 1 minuto. Se recogieron los sobrenadantes y se neutralizaron con una mezcla de KOH 3M y trietanolamina 1,5M durante 2 minutos a 4°C, agitando vigorosamente. Seguidamente se centrifugó a 13.700 g durante 1 minuto y se recogieron de nuevo los sobrenadantes, que se almacenaron a 4°C.



A continuación, los sobrenadantes se incubaron con AMPc tritiado y la proteína de unión durante 2 horas a 4°C. Para obtener una estimación de la concentración de AMPc en pmoles/mg de proteína, en algunos tubos se añadieron cantidades conocidas de AMPc para la realización de una recta patrón (Tabla III. 2). La reacción se detuvo mediante la adición de 200 µl de carbón vegetal seguida de una centrifugación a 12.000 g durante 1 minuto. Del sobrenadante resultante se tomaron 200 µl, a los que se añadió 2,2 ml de líquido de centelleo, tras lo cual se procedió a la medida de la radiactividad.

Tubo (x2) unión	Tampón	AMPc (patrón)	Problema	[ <sup>3</sup> H]AMPc	Proteína de
1	150 µl	-	-	50 µl	-
2	50 µl	0 pmol	-	50 µl	100 µl
3	-	1 pmol	-	50 µl	100 µl
4	-	2 pmol	-	50 µl	100 µl
5	-	4 pmol	-	50 µl	100 µl
6	-	8 pmol	-	50 µl	100 µl
7	-	16 pmol	-	50 µl	100 µl
8, etc (x3)	-	-	50 µl	50 µl	100 µl

Tabla III.2. Volúmenes de los distintos reactivos para una curva patrón y muestras problema.

## 2.6. Determinación de la concentración citosólica de calcio libre ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>cit</sub>).

La concentración citosólica de calcio en la población de sinaptosomas se determinó mediante la sonda fluorescente Fura 2, polianión hidrofílico que une calcio de forma específica. En los ensayos se utilizó el éster acetoximetil, Fura 2-AM, que es suficientemente lipofílico para atravesar la membrana plasmática y alcanzar el interior celular, donde las esterasas citosólicas rompen el enlace éster. El Fura 2 liberado queda confinado en el citosol donde se une al Ca<sup>2+</sup> libre para formar el complejo Ca<sup>2+</sup>-Fura, que da lugar a una emisión fluorescente cuyo máximo se registra a una longitud de onda de 510 nm, produciéndose además un desplazamiento en el máximo de su espectro de excitación ultravioleta de 380 nm a 340 nm.

Como nuestro equipo de fluorimetría tarda unos 7 segundos en cambiar la excitación de 340 a 380 nm y por tanto limitaba el número de datos que se podían obtener, los ensayos se realizaron a una única longitud de onda de excitación (340 nm), para poder así registrar los datos con intervalos de 0,3 segundos, realizando, eso sí, la correspondiente calibración (determinación de las fluorescencias máxima y mínima) al final de cada ensayo.

Los sinaptosomas se resuspendieron (2 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) y se preincubaron en un baño termostatzado a 37°C en agitación continua. A los 5 minutos se añadieron  $\text{CaCl}_2$  1,33mM y Fura 2-AM 5  $\mu\text{M}$ , continuando la incubación durante 25 minutos más. Transcurrido este tiempo, la suspensión de sinaptosomas se lavó mediante centrifugación a 12.000 g durante 1 minuto, y el precipitado se resuspendió en medio HBM sin BSA (0,67 mg/ml). Para el ensayo se transfirió 1 ml de esta suspensión a una cubeta de fluorimetría, y se registró la señal fluorescente, fijando las longitudes de onda de excitación y de emisión en 340 nm y 510 nm, respectivamente con una rendija de excitación igual a 2,5 nm y una de emisión de 6 nm. El experimento se inició con la adición de  $\text{CaCl}_2$  1,33mM y, una vez estabilizada la señal, se añadieron los diferentes compuestos según el ensayo a realizar, procediendo finalmente a la despolarización de los sinaptosomas con KCl.

La posible contaminación con Fura extrasinaptosomal se estimó por la caída de fluorescencia observada tras la quelación del  $\text{Ca}^{2+}$  extrasinaptosomal con una mezcla de EGTA 7,5mM y Tris 45mM, pH 8.

La señal de fluorescencia mínima se obtuvo al romper los sinaptosomas mediante la adición del detergente SDS al 0,2 % en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que la señal de fluorescencia máxima se obtuvo añadiendo un exceso de  $\text{CaCl}_2$  (Fig. III. 3).

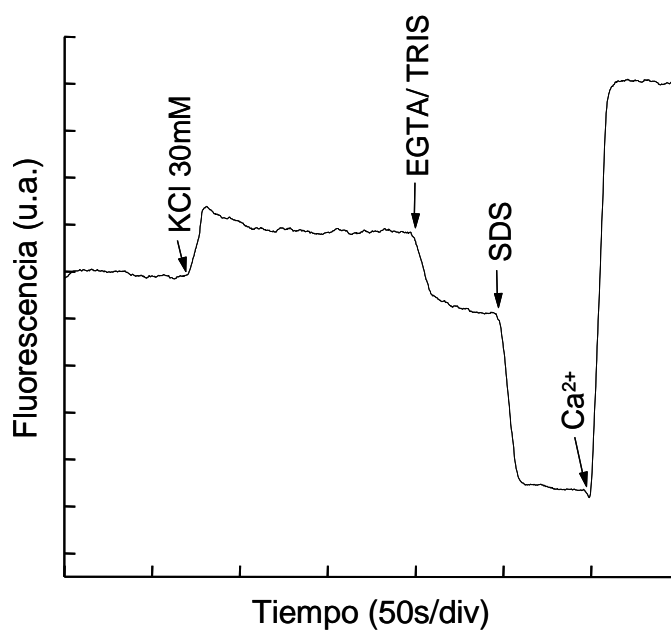


Figura III. 5. Determinación de los cambios en la concentración de calcio citosólico en sinaptosomas despolarizados con KCl 30mM.

Los datos se obtuvieron cada 0,3 segundos, y la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  se calculó aplicando la siguiente fórmula,

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{F_t - F_{\min}}{F_{\max} - F_t}$$

en la que **F<sub>t</sub>** es la fluorescencia registrada para cada tiempo y **F<sub>min</sub>** y **F<sub>max</sub>** son la fluorescencia mínima y máxima, respectivamente. El valor de la constante de disociación, **K<sub>d</sub>**, para el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -Fura es de 224 nM (Grynkiewicz y cols., 1985).

## 2.7. Cuantificación de segundos mensajeros mediante Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia (FRET).

### 2.7.1. Determinación de los niveles intrasinaptosomales de inositol monofosfato (IP<sub>1</sub>).

La hidrólisis de fosfatidil inositol (4,5)-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) llevada a cabo por fosfolipasa (PLC) da lugar a la formación de diacilglicerol e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). Este último puede ser fosforilado por la IP<sub>3</sub> quinasa para generar D-mio-inositol 1, 3, 4, 5-tetraquisfosfato (IP<sub>4</sub>) (Irvine y cols., 1986) o ser degradado a mio-inositol 1,4-bifosfato por la acción de una inositol polifosfatasa 5 (Pattni y cols., 2004). A continuación, ambos metabolitos entran en la ruta metabólica de los inositoles fosfato en la que una serie de inositol fosfatasas realizan una hidrólisis secuencial de D-mio-inositol bifosfatos dando lugar a distintos D-mio-inositol monofosfatos, denominados como D-mio-inositol 1 monofosfato (IP<sub>1(1)</sub>), -3 monofosfato (IP<sub>1(3)</sub>) y -4 monofosfato (IP<sub>1(4)</sub>) dependiendo de la posición del grupo fosfato en el anillo inositol (Majerus y cols., 1999; Irvine y cols., 2001). Finalmente, estos D-mio-inositol monofosfatos son degradados a mio-inositol por la acción de la mio-inositol monofosfatasa (Parthasarathy y cols., 1994; Attack y cols., 1995). Dado que se ha demostrado que altas concentraciones de LiCl inhiben tanto esta última enzima como la inositol polifosfatasa 1 (Berridge y cols., 1982; Liu y cols., 2003), responsable de la generación de IP<sub>1(3)</sub> e IP<sub>1(4)</sub> pero no de IP<sub>1(1)</sub>. De este modo, la determinación de la acumulación de IP<sub>1(1)</sub> puede usarse en lugar de IP<sub>3</sub>, para monitorizar la activación de PLC mediada por receptores metabotrópicos asociados a proteínas G (Trinquet y cols., 2006) (fig. III.2).

De este modo, el laboratorio Cis Bio ha desarrollado un sistema de detección de fluorescencia de alta resolución temporal (HTRF) para cuantificar IP<sub>1</sub> que se basa en la tecnología de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Este ensayo usa un anticuerpo contra IP<sub>1</sub> marcado con el fluoróforo, criptato de europio, que actúa como donador de energía de fluorescencia de tal manera que tras ser excitado a 337 nm emite fluorescencia a una longitud de onda (620 nm) que coincide con la ventana de excitación del aceptor de FRET, que en este caso un análogo de IP<sub>1</sub> marcado con el fluoróforo d2, que, a su vez, va a emitir fluorescencia a una longitud de onda mayor (665 nm) que es la que vamos a cuantificar. De tal modo que cuando el anticuerpo esté unido al IP<sub>1</sub> marcado, la señal FRET será máxima e irá disminuyendo a medida que sea desplazado por competición con el IP<sub>1</sub> generado por la

activación de PLC por receptores metabotrópicos asociados a proteínas G en las terminaciones nerviosas (fig. III.6).

A efectos prácticos, los sinaptosomas de corteza cerebral de rata adulta se resuspendieron (0,67 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1mg/ml) libre de ácidos grasos y se incubaron durante una hora a 37°C en agitación continua en presencia de LiCl (50 mM) y de adenosina desaminasa (1,25 U/mg de proteína) durante los últimos 30 y 35 minutos, respectivamente. En este tiempo se realizaron las incubaciones con el agonista L-AP4 y los demás fármacos a los tiempos indicados en las leyendas de las figuras correspondientes. A continuación, se paró la reacción en hielo y los sinaptosomas se lavaron mediante centrifugación a 13700 g durante 1 minuto (4°C) para después descartar el sobrenadante y resuspender los precipitados en 70 µl (14 mg/ml) de tampón de estimulación proporcionado por el kit (Hepes 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 1mM; MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM; KCl 4,2 mM; NaCl 146 mM; glucosa 5,5 mM; LiCl 50 mM; pH 7,4) y transferirlos a placas de 96 pocillos. En algunos pocillos se añadieron cantidades conocidas de IP<sub>1</sub> para la realización de una recta patrón y en dos pocillos sólo se añadieron 70 µl tampón de estimulación, uno de ellos se usó para determinar el fondo (blanco) y otro para determinar la señal de FRET máxima. Después de esto, adicionamos 15 µl de anticuerpo contra IP<sub>1</sub> marcado con criptato previamente diluido en el tampón de lisis proporcionado con el kit [Hepes 50 mM; fluoruro de potasio 0,8 M; BSA 0,2% (peso/volumen); Triton X-100 1 % (volumen/volumen); pH 7,0) en todos los pocillos excepto en el destinado a blanco (en el que se añadieron 15 µl de tampón de lisis) así como 15 µl del análogo de IP<sub>1</sub> marcado con el aceptor de FRET, d2; este último sí fue añadido en todos los pocillos (fig. III. 6).

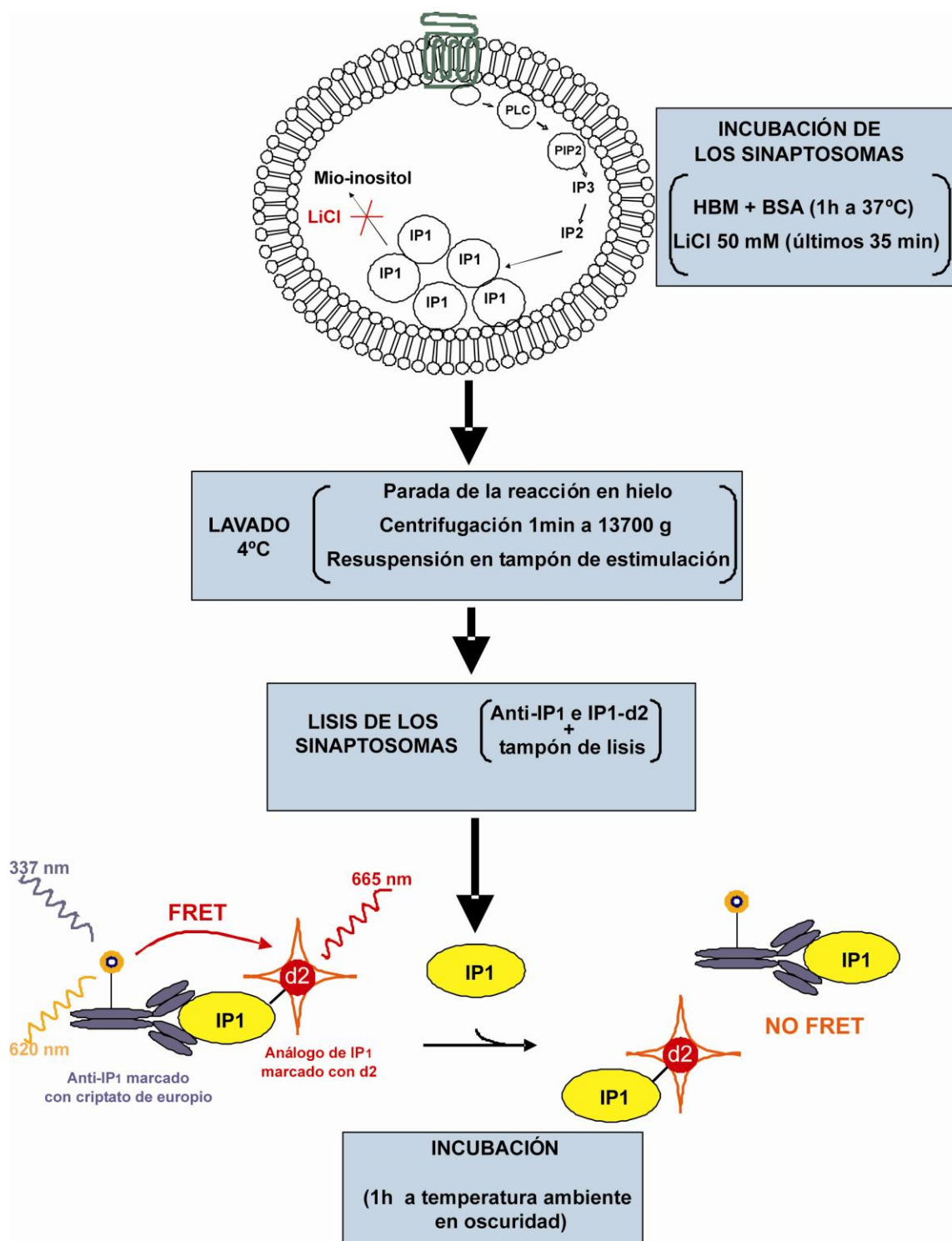


Tabla III.6. Esquema de la determinación de los niveles intrasinaptosomales de IP<sub>1</sub> mediante la técnica de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET).

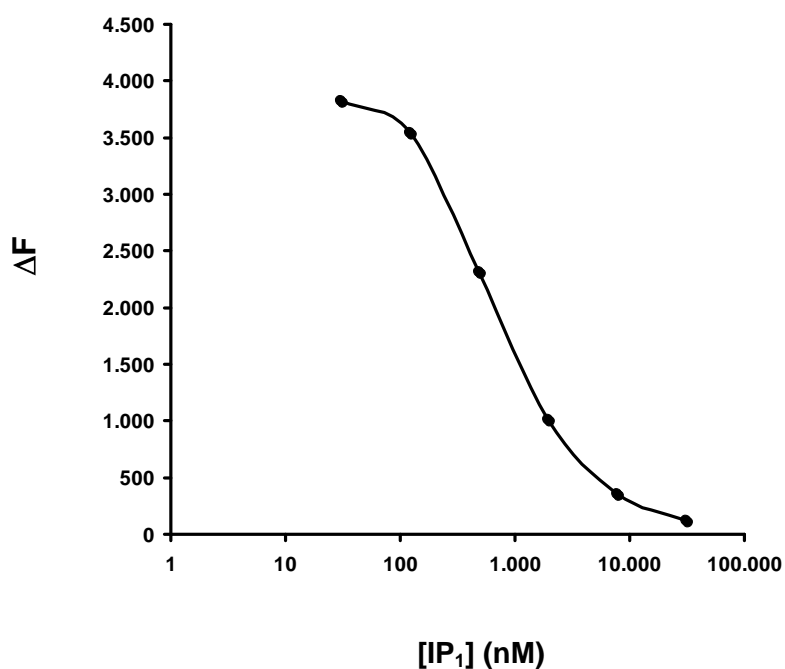
Tras una hora de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, mediante un fluorímetro FluoStar se realizó la medida de la fluorescencia emitida tanto por el donador de FRET criptato de europio (a 620 nm) como por el aceptor, d2 (a 665 nm, señal FRET) 50  $\mu$ s después de la excitación del criptato a 337 nm. La señal de FRET se calculó como la relación :

$$\text{FRET} = \frac{\text{Fluorescencia emitida por el aceptor de FRET, d2 (a 665 nm)}}{\text{Fluorescencia emitida por el donador de FRET, criptato (a 620 nm)}} \times 10.000$$

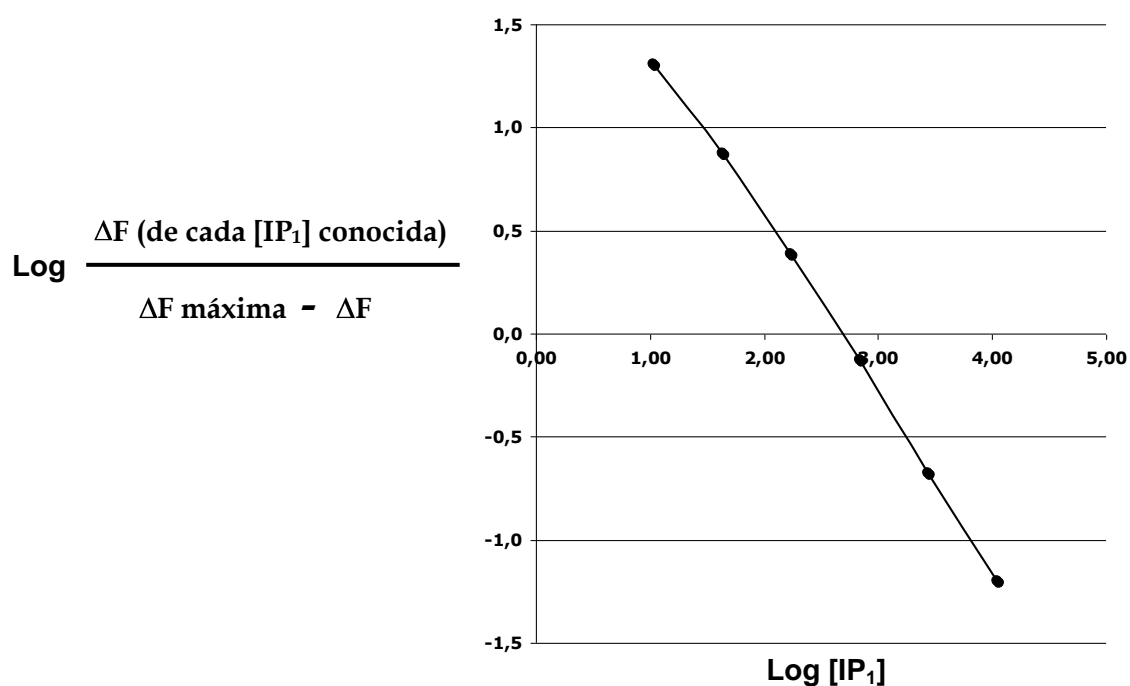
De este modo, a medida que el IP<sub>1</sub> producido de forma endógena desplace a su análogo marcado con d2 disminuirá la transferencia de fluorescencia hacia éste donador y disminuirá ésta relación. Así, partiendo de esta relación, el incremento específico de FRET ( $\Delta F$ ) se determinó sustrayendo el fondo (blanco), que fue la fluorescencia en ausencia de aceptor d2, mediante la relación:

$$\Delta F = \frac{\text{FRET (de cada concentración de IP}_1 \text{ conocida - FRET (blanco) o de las muestras a determinar)}}{\text{FRET (blanco)}} \times 100$$

De este modo, partiendo del valor de  $\Delta F$  de las concentraciones conocidas de IP<sub>1</sub> ([IP<sub>1</sub>]) se obtiene la siguiente curva:



A continuación, la curva anterior se transformó para obtener una recta que puede considerarse lineal en el intervalo de concentraciones usado:



(Siendo  $\Delta F$  máxima el incremento de fluorescencia del pocillo con criptato y d2 pero sin IP<sub>1</sub> no marcado.). De este modo, podemos determinar la concentración de IP<sub>1</sub> de las muestras problema interpolando sus valores de  $\Delta F$  en dicha recta.



### 2.7.2. Determinación de los niveles intrasinaptosomales de AMPc mediante FRET.

Los sinaptosomas de corteza cerebral de rata adulta se resuspendieron (0,67 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1mg/ml) libre de ácidos grasos y se incubaron durante una hora a 37°C en agitación continua en presencia del inhibidor de fosfodiesterasas, Ro-20-1724 (0,1 mM) y de adenosina desaminasa (1,25 U/mg de proteína) durante los últimos 30 y 35 minutos, respectivamente. En este tiempo se realizaron las incubaciones con el agonista de los receptores metabotrópicos del grupo III, L-AP4 y con el activador de adenilato ciclasa, forskolina, según se indica en la leyenda de las figuras. A continuación se paró la reacción en hielo y los sinaptosomas se lavaron mediante centrifugación a 13700 g durante 1 minuto (4°C) para después descartar el sobrenadante y resuspender los precipitados en 70 µl (14 mg/ml) en el tampón de estimulación proporcionado por el kit (tampón fosfato 50 mM; pH 7,0 ; BSA 0,2 %; NaN<sub>3</sub> 0,02 %) para después ser transferidos a placas de 96 pocillos. En algunos pocillos se añadieron cantidades conocidas de AMPc para la realización de una recta patrón y en dos pocillos sólo se añadieron 70 µl tampón de estimulación, uno de ellos se usó para determinar el fondo (blanco) y otro para determinar la señal de FRET máxima. Después de esto, adicionamos 15 µl de anticuerpo contra AMPc marcado con criptato previamente diluido en el tampón de lisis proporcionado con el kit (tampón fosfato 50 mM; pH 7,0; KF 1 M; Tritón X-100 1,25 %) en todos los pocillos excepto en el destinado a blanco (en el que se añadieron 15 µl de tampón de lisis) así como 15 µl del análogo de AMPc marcado con el aceptor de FRET, d2; este último sí fue añadido en todos los pocillos.

A continuación, y tras una incubación de 1 hora en oscuridad y a temperatura ambiente. Después, del mismo modo que para la determinación de IP<sub>1</sub>, mediante un fluorímetro FluoStar, se realizó la medida de la fluorescencia emitida tanto por el donador de FRET criptato de europio (a 620 nm) como por el aceptor, d2 (a 665 nm, señal FRET) 50 µs después de la excitación del criptato a 337 nm. El procesamiento de los datos hasta determinar la concentración intrasinaptosomal de AMPc de las muestras problema, se realizó de forma idéntica a la descrita en el apartado anterior sobre la determinación de IP<sub>1</sub>.

## 2.8. Cuantificación de la translocación de la proteína Munc13-1.

### 2.8.1. Aislamiento de las fracciones soluble y particulada.

Los sinaptosomas de corteza cerebral de rata adulta se resuspendieron (0,67 mg/ml) en un medio HBM (NaCl 140 mM, KCl 5mM, NaHCO<sub>3</sub> 5mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; pH 7,4) suplementado con BSA (16 µM) libre de ácidos grasos y se incubaron durante una hora en agitación continua a 37 °C y en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg de proteína) durante la última media hora así como en presencia o en ausencia del agonista, L-AP4 1mM o del éster de forbol, PDBu 1µM durante los últimos 10 y 2 minutos, respectivamente.

Tras la incubación de una hora, los sinaptosomas se lavaron mediante centrifugación a 13700 g durante 1 minuto para continuación, resuspenderlos en un medio hipo-osmótico (tamponado a pH 7 con tris-HCl 8,3 mM suplementado con el inhibidor de proteasas, Proteasa Inhibitor Cocktail Kit de ThermoScientific, 1:100) con el fin de producir la lisis de éstos. Como ayuda suplementaria al proceso de lisis hipo-osmótica la suspensión de sinaptosomas fue sometida a 5 pases a través de una jeringuilla de calibre 20 para, a continuación, mantenerse en agitación continua durante media hora a 4° C.

Transcurrido este tiempo, las fracciones soluble y particulada procedentes de cada tratamiento se separaron mediante centrifugación a 40.000 g durante 10 minutos obteniéndose un sobrenadante y un precipitado correspondientes a las fracciones soluble y particulada, respectivamente. Después, se procedió a la resuspensión del precipitado en tampón RIPA (Tritón X-100 1%; desoxicolato sódico 0,5%; SDS 0,2 %; NaCl 100 mM, EDTA 1mM; Tris-HCl 50 mM; inhibidor de proteasas 1:100; pH 7,4).

Finalmente, se determinó la concentración de proteínas de cada fracción mediante el método de Bradford: del mismo modo que en el método de biuret, además de las muestras problema, se prepararon tubos con concentraciones conocidas de BSA así como un tubo donde sólo se añadieron los medios de resuspensión de ambas fracciones (blanco) para, tras la adición en cada tubo del kit comercial Bio-Rad Protein Assay y una incubación de 5 minutos, medir la absorbancia a 595 nm y construir una recta patrón donde poder interpolar los valores de las muestras problema y así conocer su concentración de proteínas totales.

### 2.8.2. Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa de las fracciones soluble y particulada.

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la siguiente reacción:

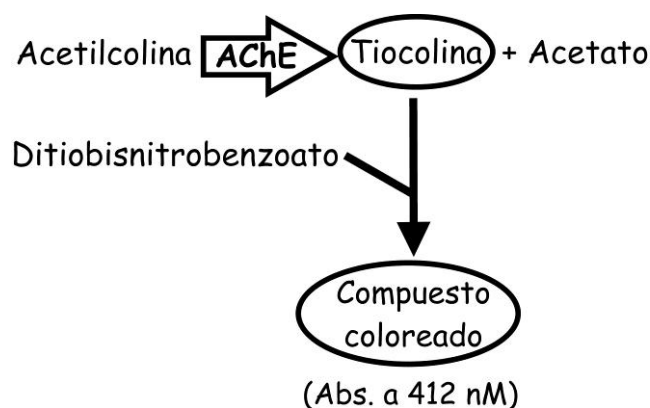


La excitación a 340 nm del coenzima NADH provoca la emisión de fluorescencia a 460 nm. Así, para determinar la actividad lactato deshidrogenasa de las fracciones soluble y particulada (procedentes de los distintos tratamientos) se cuantificó la pérdida de fluorescencia 460 nm producida por la oxidación de NADH tras la adición de piruvato.

A efectos prácticos, alícuotas de entre 5 y 20  $\mu\text{l}$  [según la riqueza en LDH de cada una de las fracciones, con el fin de mantener siempre la enzima saturada de sustrato (cinética de orden 0) y que la caída de fluorescencia sea proporcional al contenido en LDH) de las suspensiones correspondientes a las fracciones soluble y particulada se añadieron en una cubeta de fluorimetría que contenía 1 ml de medio con tampón fosfato potásico (50 mM), Tritón X-100 (10 %) y NADH (14 mg/ml). A continuación, determinamos la fluorescencia inicial a 460 nm de la muestra tras la excitación de la coenzima NADH a 340 nm [mediante un fluorímetro Perkin Elmer en condiciones de temperatura (37,4°C) y agitación constantes] así como la caída ésta tras la adición de piruvato 1mM. De este modo, la caída en la fluorescencia a 460 nm observada es directamente proporcional a las unidades arbitrarias de actividad de LDH por mg de proteína de cada fracción.

### 2.8.3. Determinación de la actividad acetilcolinesterasa de las fracciones soluble y particulada.

La actividad acetilcolinesterasa (AChE) de cada una de las fracciones se determinó mediante el método colorimétrico descrito por Ellman y colaboradores en 1961 basado en el acoplamiento de las siguientes reacciones:



En nuestro caso, alícuotas de entre 3 y 10  $\mu\text{l}$  (dependiendo de la riqueza en acetilcolinesterasa) de las fracciones soluble y particulada procedentes de los distintos tratamientos fueron añadidas en los pocillos de una placa de 96 que contenían 200  $\mu\text{l}$  de un medio con tampón fosfato potásico 100 mM (pH 8) y yoduro de acetiltiocolina 0,75 mM. A continuación, se determinó la absorbancia basal a 412 nm de las muestras (mediante un fluorímetro FluoStar) y la formación de un compuesto de color amarillo (con el consiguiente incremento de la absorbancia a 412 nm) tras la adición del reactivo de Ellman [5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato)] a una concentración de 0,2 mM. De este modo, se determinó la actividad acetilcolinesterasa en unidades arbitrarias de actividad por mg. de proteína de cada fracción.

#### 2.8.4. Inmunotransferencia (*western blotting*).

Las fracciones soluble y particulada, diluidas en tampón de carga Laemmly (SDS 2%; glicerol 10 %; Tris-HCl 0,3 M;  $\beta$ -mercaptoetanol 5%; pH 6,8), fueron cargadas (4  $\mu$ g de proteína por pocillo) en un gel de poliacrilamida [poliacrilamida 7,5 %; Tris-HCl 0,37 M; SDS 0,1 %; persulfato amónico 0,05 %; (Tris), N,N,N,N'-tetrametilnediamina 0,001 %] y sometidas a electroforesis (PAGE-SDS) durante una hora y media a 4° C y amperaje constante (20 mA ; tampón de electroforesis: Tris-Base 25 mM; SDS 0,1 %; glicina 1,5 %).

Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue transferido electroforéticamente (transferencia en húmedo) a una membrana de nitrocelulosa [durante toda la noche a 4 ° C y amperaje constante (48 mA) y en un tampón que contenía Tris-Base 25 mM; 1,5 % de glicina así como un 20 % de metanol]. A la mañana siguiente, con el fin de impedir la unión específica de los anticuerpos primarios a la membrana, ésta se incubó durante una hora con el tampón de bloqueo proporcionado por el sistema de inmunotransferencia Odyssey en agitación constante y temperatura ambiente. A continuación, se llevó a cabo la incubación de la membrana durante una hora (también en agitación constante y temperatura ambiente) con los anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra munc 13-1 (1:200) y  $\beta$ -tubulina (1:2000) así como con los anticuerpos policlonales de conejo frente munc 13-1 (1:1000), vGluT1 (1:7000) o contra la subunidad  $\beta_1$  de la ATPasa de sodio/potasio (1:3500) diluídos en tampón de bloqueo Odyssey con Tween al 0,1 %. Después, se realizaron 4 lavados de 5 minutos en tampón PBS suplementado con Tween al 0,1 % para, seguidamente, incubar durante 1 hora con los anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón y anti-conejo conjugados con las sondas infrarrojas de 680 nm y 800 nm proporcionados por el sistema de inmunotransferencia, Odyssey. Tras la incubación con los secundarios también se realizaron 4 lavados de 5 minutos en tampón PBS suplementado con Tween al 0,1 % así como un último lavado en tampón PBS sin Tween. Finalmente, la membrana se escaneó mediante el sistema de detección LI-COR de Odyssey tanto en el canal de 680 como en el de 800 nm y se realizó la cuantificación mediante el sistema de análisis también proporcionado por Odyssey. De este modo, se obtuvo la intensidad integrada (en unidades arbitrarias) de munc 13-1, vGluT1 y  $\beta_1$  de la ATPasa normalizados respecto al control de carga de cada calle que fue el valor de intensidad integrada de  $\beta$ -tubulina.

## 2.9. Experimentos de coimmunoprecipitación.

Los sinaptosomas de corteza cerebral de rata se resuspendieron (2 mg/ml) y homogeneizaron en tampón RIPA [Tris 50 mM; pH 7,4; NaCl 100 mM; Triton X-100 1 %; desoxicolato sódico 0,5 %; SDS 0,2 %; EDTA 1 mM e inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich) 1:100] dejando actuar este tampón durante media hora a 4 °C. Una vez solubilizadas, las suspensiones se centrifugaron durante media hora a 13000 g y los sobrenadantes resultantes se inmunoprecipitaron durante toda la noche a 4 °C y en rotación constante con los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal de ratón frente a munc 13-1 (5 µg/ml) y policlonal de conejo dirigido contra mGluR7a (5 µg/ml). Como control negativo de los anticuerpos de ratón y de conejo se usó anticuerpos obtenidos en estos animales dirigidos contra una proteína que no se encuentra en nuestra preparación de terminaciones, en concreto contra el polipéptido sintético Flag, a una concentración similar a la del resto de los anticuerpos empleados (5 µg/ml).

A la mañana siguiente, las muestras se incubaron durante una hora (a 4° en constante rotación) con las esferas de inmunoprecipitación (20 % volumen/volumen); para las suspensiones inmunoprecipitadas con anticuerpos de ratón se usaron esferas de proteína A agarosa mientras que para aquellas inmunoprecipitadas con anticuerpos de conejo se emplearon las esferas proporcionadas por el sistema TrueBlot (eBioscience). Tras la incubación con las esferas, se realizaron tres lavados con tampón RIPA [Tris 50 mM; pH 7,4; NaCl 100 mM; Triton X-100 1 %; desoxicolato sódico 0,5 %; SDS 0,2 %; EDTA 1 mM e inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich) 1:100] en los que se centrifugaron las muestras a 10.000 g (1 minuto) y los precipitados se mezclaron suavemente (agitando por inversión) con el tampón añadido cada vez. Tras la última centrifugación, se eliminó totalmente el sobrenadante mediante aspiración con una jeringuilla de calibre 28 (para evitar aspirar también las esferas) y se añadieron 100 µl de tampón de carga Laemmly (Tris-HCl 0,125M; pH 6,8; SDS 4 %; glicerol 20 %; azul de bromofenol 0,004 %) para, a continuación, disociar los inmunocomplejos mediante la adición de DTT 50 mM recién preparado, fuerte agitación y calentamiento de la muestra a 90 ° C durante 10 minutos.

Después, las muestras fueron centrifugadas a 10.000 g durante 3 minutos y se recogieron con sumo cuidado los sobrenadantes (evitando recoger las esferas) para cargarlos después en un gel de poliacrilamida al 6,5 % (Tris-Base 0,37 M; pH 8,8; persulfato amónico 0,01 %; SDS 0,1%; TEMED 0,001 %) y someterlos a electroforesis (PAGE-SDS) durante 1 hora y media a voltaje constante (150 V). Una vez finalizada la electroforesis, se llevó a cabo la

transferencia en semihúmedo durante 45 minutos a voltaje constante (20 V) (tampón del ánodo: Tris-Base 0,3 M y metanol al 20 %; tampón del cátodo: ácido 6-amino caproico 40 mM y metanol al 20 %) del gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (previamente tratada con metanol al 100 %).

A continuación, para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos primarios a la membrana, ésta se bloqueó durante 1 hora en PBS suplementado con Tween al 0,05 % y leche desnatada liofilizada al 5 % para, seguidamente, incubar con el anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra munc 13-1 (1:1000; diluido en tampón de bloqueo con leche desnatada al 5 %) durante toda la noche a 4 ° C y agitación constante.

A la mañana siguiente, la membrana se lavó 3 veces con tampón PBS suplementado con Tween al 0,05 % durante 5 minutos para, posteriormente, ser incubada en presencia del anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano. Como tanto los anticuerpos primarios usados para la inmunoprecipitación de mGluR7a como para la inmunotransferencia (o *western blotting*) (dirigido contra munc 13-1) son de conejo, es posible que el anticuerpo secundario anti-conejo se una tanto a las inmunoglobulinas correspondientes al anticuerpo primario usado en la inmunotransferencia como a las inmunoglobulinas residuales correspondientes al anticuerpo primario usado en la inmunoprecipitación que hayan sido cargadas en el gel junto con las proteínas inmunoprecipitadas. Para evitar este fenómeno, se usó el anticuerpo secundario del sistema TrueBlot (1:1000; diluido en tampón de bloqueo con leche desnatada al 5 %), que se une específicamente a las inmunoglobulinas de conejo pertenecientes a los anticuerpos primarios usados en la inmunotransferencia, que no han sido sometidas a desnaturalización, pero no a las inmunoglobulinas residuales procedentes de la inmunoprecipitación, ya que estas últimas sí han sido desnaturalizadas mediante DTT, SDS y calor; de este modo, se evita que el marcaje correspondiente a las inmunoglobulinas residuales de la inmunoprecipitación interfiera con el de las proteínas de interés. Finalizada la incubación de 1 hora con el secundario TrueBlot (en oscuridad, temperatura ambiente y agitación constante), se realizaron tres lavados de 5 minutos en PBS con Tween al 0,05 % para, a continuación, llevar a cabo el revelado del anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano unido a la membrana mediante el kit de revelado Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoScientific). Este kit, contiene una mezcla de peróxido de hidrógeno, sustrato quimioluminiscente Luminol y un potenciador de quimioluminiscencia (Pierce); de este modo, al entrar en contacto con esta mezcla, la peroxidasa de rábano (mediante el peróxido de hidrógeno) oxida al luminol dando lugar a una quimioluminiscencia que va a

estar incrementada por el potenciador de quimioluminiscencia y que, finalmente, tras un tiempo de revelado de entre 5 y 10 minutos (dependiendo de la intensidad y grado de saturación de la señal) detectamos con un equipo de imagen LAS-3000 de Fujifilm Life Science.

Como tras la inmunotransferencia, hemos teñido la membrana con el anticuerpo primario anti munc 13-1, podemos observar la banda correspondiente a la proteína munc 13-1 inmunoprecipitada con anti-munc 13-1 así como la banda correspondiente a munc 13-1 inmunoprecipitada con anti-mGluR7. Sin embargo, no podemos observar el ensayo inverso, es decir, las banda correspondientes al receptor mGlu7 inmunoprecipitado con anti- munc 13-1 o aquella que correspondería a la proteína munc 13-1 inmunoprecipitada con anti munc 13-1. Por ese motivo, una vez adquirido la imagen de la membrana, eliminamos tanto el anti-munc 13-1 como el secundario True-Blot de la membrana (*stripping*) mediante la incubación con Re-Blot Plus Strong (Millipore) durante 20 minutos (agitación constante) y dos lavados en PBS con Tween al 0,05 % para, a continuación bloquearla con PBS (con Tween 0,05 % y leche desnatada al 5 %) e incubarla de nuevo toda la noche (4 °C y agitación constante) pero esta vez con el anticuerpo de ratón anti-mGluR7a y, del mismo modo, repetir el proceso de incubación con el secundario y revelado ya descritos (fig. III. 7).



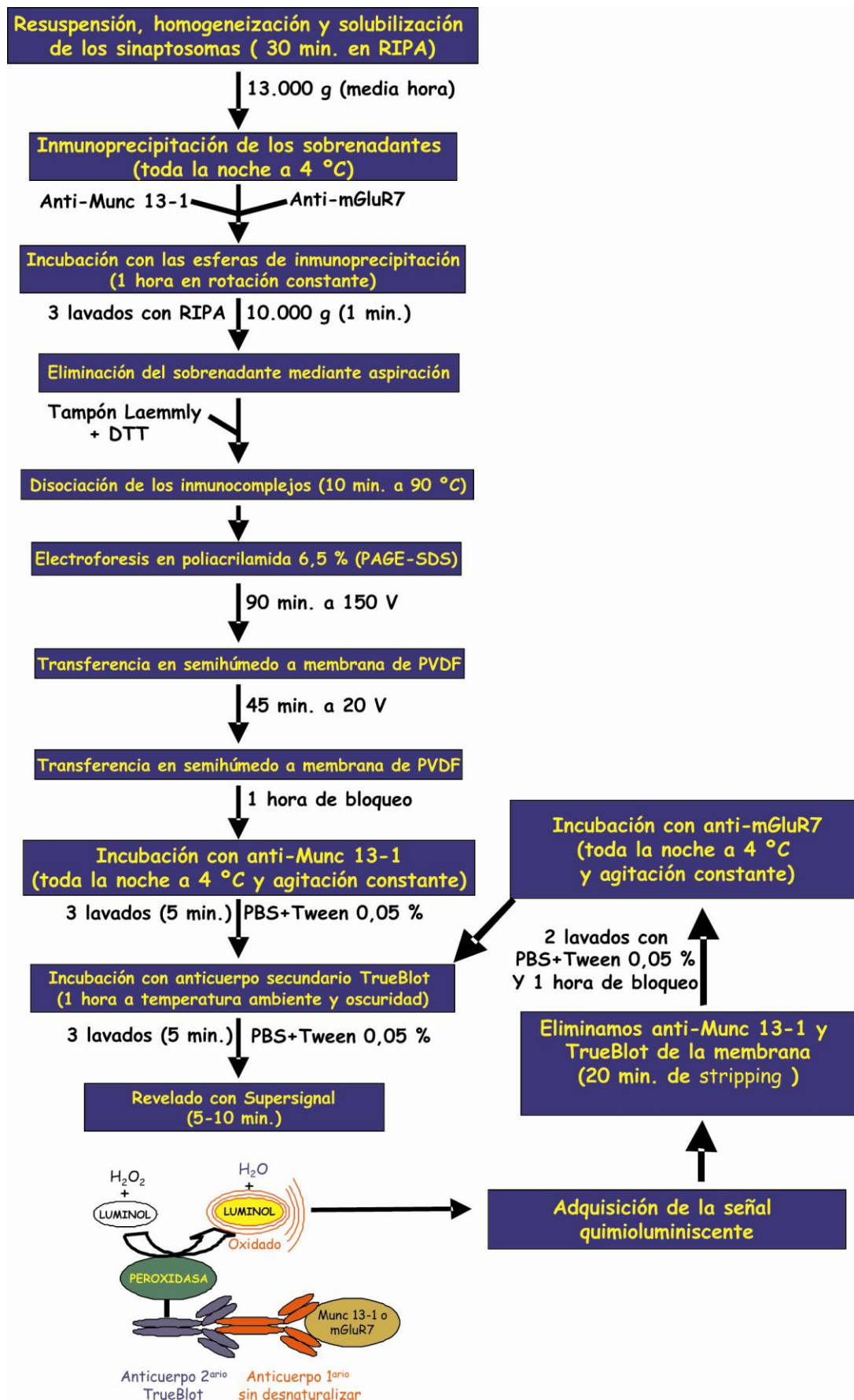


Figura III. 7. Procedimiento utilizado en los experimentos de co-inmunoprecipitación

## **IV. RESULTADOS**

## 1. Modulación de los canales de calcio de tipo P/Q por mGluR7 en terminaciones sinápticas de hipocampo.

En el cerebro de rata se expresan tres subtipos de receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III (mGluR4, mGluR8 y mGluR7) que se localizan en la zona activa presináptica de las terminaciones nerviosas glutamatérgicas (Bradley y cols., 1996; Shigemoto y cols., 1996). En estas sinapsis excitadoras, los receptores del grupo III reducen la liberación de glutamato (Forsythe y Clements, 1990; Trombley y Westbrook, 1992; Gereau y Conn, 1995; Herrero y cols., 1996; Millán y cols., 2002a) mediante la inhibición de la actividad de los canales de calcio y de la adenilato ciclasa, que requiere la activación de proteínas Gi/o (Okamoto y cols., 1994; Conn y Pin, 1997). La reducción de la liberación de glutamato inducida por despolarización se ha relacionado con la inhibición de canales de calcio por las subunidades  $\beta\gamma$  liberadas de los complejos heteroméricos de las proteínas G (O'Connor y cols., 1999; Millán y cols., 2002a). mGluR7 presenta en su extremo carboxilo terminal sitios de interacción con diversas proteínas, de entre las que destaca calmodulina (O'Connor y cols., 1999; El Far y cols., 2001). La unión de calmodulina impide la unión de las subunidades  $\beta\gamma$  a dicho dominio C-terminal, posibilitando su unión a los canales de calcio y, en consecuencia, la inhibición de la transmisión sináptica (O'Connor y cols., 1999). Por otro lado, mGluR7 también presenta sitios susceptibles de fosforilación tanto por proteína quinasa A (Cai y cols., 2001) como por proteína quinasa C (Nakajima y cols., 1999; Dev y cols., 2000). La fosforilación de mGluR7 por PKC antagoniza la unión de calmodulina (Nakajima y cols., 1999; Airas y cols., 2001), suprimiendo de esta manera la acción inhibidora de la liberación de los mGluR del grupo III (Herrero y cols., 1996; Macek y cols., 1998; Millán y cols., 2002a).

La liberación de glutamato en las sinapsis glutamatérgicas depende en gran medida de la actividad de los canales de calcio de tipo P/Q y en menor grado de los canales del tipo N (Luebkey cols., 1993; Mintz y cols., 1995; Turner y Dunlap 1995; Vázquez y Sánchez-Prieto 1997). La extrema importancia de la función de los canales de calcio del tipo P/Q en la neurotransmisión se pone especialmente de manifiesto en el hecho de que los ratones deficientes en la subunidad principal  $\alpha_{1A}$  presenten alteraciones en su sistema nervioso (ataxia, distonia) (Jun y cols., 1999) que resultan incompatibles con la vida. En cambio, los ratones deficientes en la subunidad  $\alpha_{1B}$  tienen un periodo de vida normal sin aparentes alteraciones en el sistema nervioso (Ino y cols., 2001). Esto estaría de acuerdo con el hecho de que los canales P/Q sean cuantitativamente más

importantes en la neurotransmisión glutamatérgica que los canales N, tanto en ratas jóvenes (Takahashi y Momiyama 1993; Luebke y cols., 1993; Wheeler y cols., 1994) como en ratas adultas (Scholtz y Miller 1995; Scholtz y Miller 1996; Iwashaki y cols., 2000; Millán y cols, 2002b, 2002c). Sin embargo, a pesar de la mayor importancia cuantitativa de los canales de calcio de tipo P/Q en la transmisión sináptica, en algunas regiones cerebrales como la corteza los receptores mGlu7 modulan selectivamente los canales de tipo N (Millán y cols., 2002a y 2003; Capogna 2004).

Además de las vías de señalización indicadas, en células granulares de cerebelo transfectadas con mGluR7 somáticos se ha identificado un mecanismo de inhibición de los canales de calcio del tipo P/Q somáticos dependiente de la actividad de fosfolipasa C y de PKC (Perroy y cols., 2000). Este mecanismo de acción parece incompatible con las numerosas evidencias de supresión por PKC de las respuestas a los receptores mGluR del grupo III en sinapsis de hipocampo, donde la transmisión sináptica depende en su mayor parte de canales P/Q (Wheeler y cols., 1994; Macek y cols., 1998).

Con estos precedentes, nos pareció interesante encontrar y definir las vías de señalización por las que mGluR7 modula la liberación de glutamato asociada a los canales de calcio de tipo P/Q. Dado que, en corteza cerebral, las acciones de mGluR7 están restringidas a las terminaciones sinápticas con canales de tipo N, realizamos estos experimentos en terminaciones sinápticas de hipocampo.

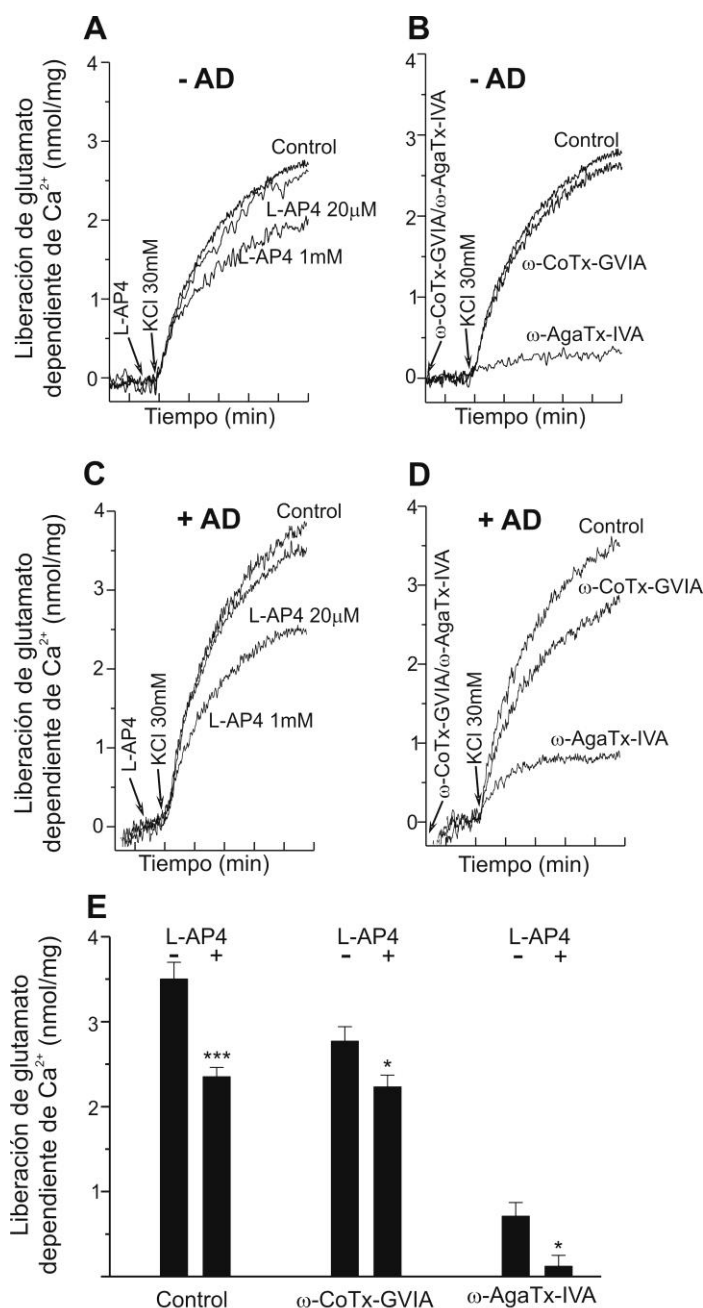
### **1.1. L-AP4 inhibe la liberación de glutamato asociada a canales de tipo N y P/Q en terminaciones sinápticas de hipocampo.**

El incremento en la concentración extracelular del ión potasio da lugar a la despolarización de la membrana de los terminales sinápticos (Scott y Nicholls, 1980), lo que desencadena la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje y la liberación del neurotransmisor glutamato. La despolarización con altas concentraciones de KCl (30mM) es un método idóneo para estudiar modulaciones de canales de calcio dependientes de voltaje ya que, en este régimen de estimulación, la liberación de glutamato es totalmente independiente de la actividad de los canales de sodio y potasio que, si bien se activan en un principio, se inactivan rápidamente permaneciendo así durante el tiempo que dura la despolarización (Tibbs y cols, 1989).

La despolarización de terminales sinápticos de hipocampo con KCl 30mM produjo una liberación de glutamato dependiente de calcio de  $2,7 \pm 0,15$  nmol de glutamato por mg. de proteína ( $\pm$ error típico,  $n=14$ , Figura IV.1A). La adición del agonista de los mGluRs del grupo III ácido L-2-amino-4-fosfonobutírico (L-AP4) a una concentración de 20  $\mu$ M, con objeto de activar los receptores metabotrópicos del grupo III de alta afinidad por glutamato (mGluR4 y mGluR8), no redujo de forma significativa la liberación ( $5,6 \pm 2,3\%$ ;  $n=8$ ;  $p>0,05$ ). Sin embargo, la liberación de glutamato se redujo significativamente ( $28 \pm 1,2\%$  de inhibición respecto a su control,  $n=8$ ,  $p<0,05$ ) (Fig. IV.1A) cuando los sinaptosomas fueron expuestos a una concentración elevada de L-AP4 (1mM) para activar mGluR de baja afinidad por este agonista. Puesto que mGluR7 es el único receptor metabotrópico de glutamato del grupo III que exhibe baja afinidad por su agonista (Okamoto y cols., 1994), parece razonable pensar que este receptor es el responsable de la inhibición de la liberación de glutamato en esta preparación de terminales sinápticos de hipocampo.

Para conocer el tipo de canal de calcio que media las acciones inhibitoras de mGluR7, primero determinamos la magnitud de la liberación de neurotransmisor asociada con los canales de calcio de tipo N y P/Q mediante el bloqueo de los mismos con sus antagonistas selectivos,  $\omega$ -Conotoxina-GVIA (Olivera y cols., 1985) y  $\omega$ -Agatoxina-IVA (Mintz y cols., 1995), respectivamente. Sorprendentemente, la liberación inducida por KCl fue reducida por  $\omega$ -Conotoxina-GVIA ( $5,3 \pm 2,3\%$ ,  $n=26$ ,  $p>0,05$ ) sólo de forma marginal, sin embargo,  $\omega$ -Agatoxina-IVA suprimió completamente la liberación ( $94,8 \pm 1,5\%$ ,  $n=15$ ,  $p<0,001$ ) (Fig. IV.1B). La ausencia de un papel relevante de los canales de calcio de tipo N en la liberación de glutamato contradice trabajos previos donde se ha demostrado que dichos canales participan en la transmisión sináptica en el hipocampo, tanto en experimentos de electrofisiología (Luebke y cols., 1993; Takahashi y Momiyama, 1993; Wheeler y cols., 1994) como en experimentos de liberación de glutamato (Bradford y Nadler 2004). La adenosina endógena podría ejercer una inhibición tónica sobre los canales de calcio tipo N (Manita y cols., 2004), por lo que realizamos los experimentos en presencia de adenosina desaminasa para eliminar un posible tono inhibitor. En estas condiciones, la liberación inducida por KCl aumentó significativamente hasta  $3,5 \pm 0,1$  (nmol/mg $\pm$ error típico,  $p<0,05$ ) y fue reducida un  $20,8 \pm 0,8\%$  ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ) tras el bloqueo de los canales N con  $\omega$ -Conotoxina-GVIA y un  $79 \pm 4,4\%$  ( $n=6$ ,  $p<0,001$ ) tras el bloqueo de los canales P/Q con  $\omega$ -Agatoxina-IVA (Fig. IV.1D), poniendo de manifiesto la existencia de una pequeña pero significativa

contribución de los canales de calcio de tipo N a la liberación de glutamato. El antagonista de los canales de calcio de tipo L, nifedipino (10 $\mu$ M), no produjo cambios significativos ( $-0,2 \pm 0,8\%$ ,  $n=4$ ,  $p>0,05$ ) en la liberación de glutamato (datos no mostrados), descartando la participación de dichos canales en la liberación del neurotransmisor. En estas condiciones, la inhibición de la liberación con L-AP4 20 $\mu$ M no fue significativa ( $7,6 \pm 3,6\%$ ,  $n=4$ ,  $p>0,05$ ) pero sí con L-AP4 1mM ( $33,0 \pm 1,4\%$ ,  $n=10$ ,  $p<0,001$ ). Una vez desenmascarado el componente de liberación asociado a los canales de calcio de tipo N, analizamos su modulación por los mGluR del grupo III; observando que la inhibición de la liberación por el agonista ( $33,0 \pm 1,4\%$ ,  $n=10$ ) fue ocluída parcial, pero significativamente, tanto por el bloqueo de los canales de calcio tipo N como P/Q con  $\omega$ -Conotoxina-GVIA ( $15,6 \pm 0,8\%$ ,  $n=6$ ,  $p<0,05$ ) y  $\omega$ -Agatoxina-IVA ( $16,9 \pm 4,4\%$ ,  $n=6$ ,  $p<0,05$ ) (Fig. IV.1E), lo que sugiere que el receptor inhibe los componentes de liberación asociados a ambos tipos de canales de calcio.



**Figura IV. 1. La presencia de adenosina desaminasa desenmascara el componente de liberación asociado a los canales de calcio de tipo N en botones sinápticos de hipocampo de rata.**

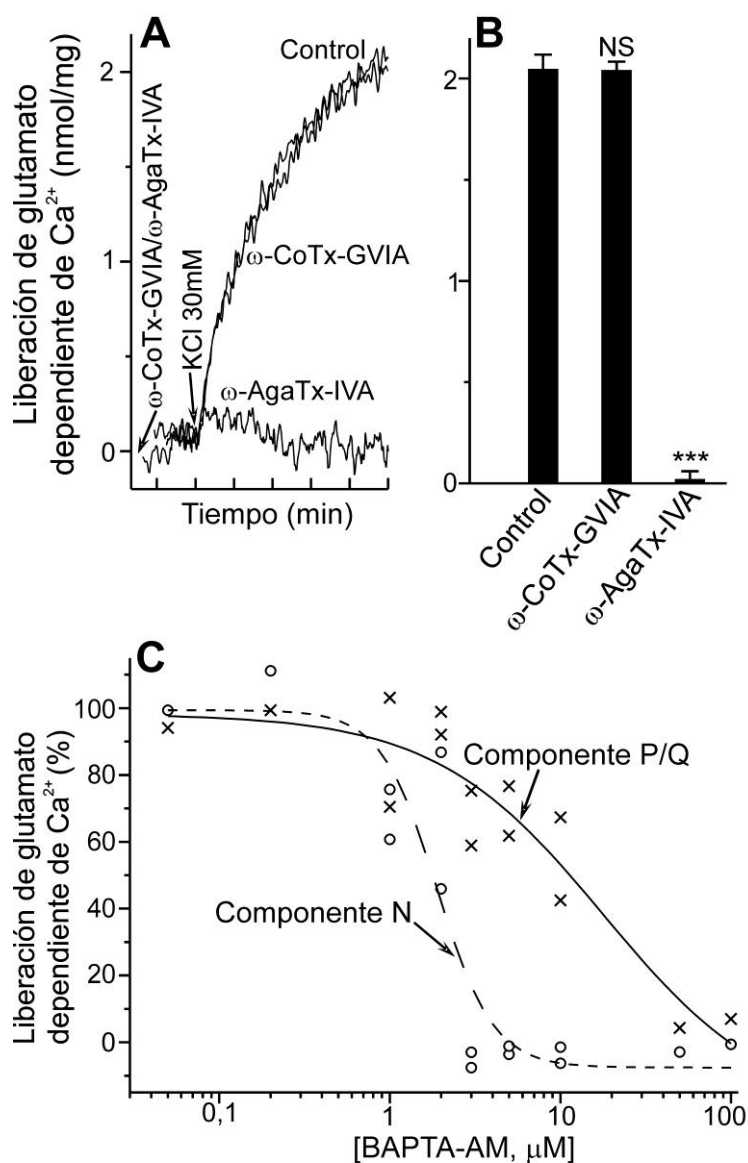
La liberación de glutamato dependiente de calcio inducida por KCl 30mM fue determinada en presencia de  $[Ca^{2+}]_{ext}$  1,33mM tanto en sinaptosomas no tratados (-AD) (A) y (B) como en sinaptosomas preincubados con adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína, 30 min.) (+AD) (C) (D) y (E), así como en ausencia (control) y en presencia de bajas (20  $\mu$ M) y altas (1mM) concentraciones de L-AP4 (A) y (C) añadido 30 segundos antes de la despolarización; y en ausencia y presencia de  $\omega$ -CoTx-GVIA (2  $\mu$ M) y de  $\omega$ -Aga-IVA (200nM) añadidas 100 segundos antes de la despolarización (B) y (D). (E), los diagramas de barras muestran la magnitud de la liberación acumulada 5 minutos después de la despolarización en presencia y ausencia (control) de las toxinas de los canales de calcio, y en ambos casos en presencia y ausencia de L-AP4 (1mM). Los datos mostrados representan la media  $\pm$  error típico de 6-26 experimentos llevados a cabo en 6-26 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores en ausencia de L-AP4 mediante el test de la *t* de Student: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ .

## 1.2. La reducción en la concentración de $\text{Ca}^{2+}$ extracelular suprime la contribución de los canales de tipo N a la liberación de glutamato.

La eliminación de la inhibición tónica por adenosina endógena puso de manifiesto la existencia de dos componentes de liberación susceptibles de ser modulados por mGluR7 en la preparación de terminaciones nerviosas de hipocampo. Como nuestro objetivo es el estudio de los mecanismos de señalización por los que mGluR7 reduce la liberación de glutamato asociada a los canales de calcio de tipo P/Q, eliminamos la contribución de los canales de calcio tipo N a la liberación valiéndonos del peor acoplamiento de estos canales a la exocitosis en comparación con los canales de tipo P/Q (Qian y Noebels 2001, Millán y Sánchez-Prieto 2002c; Millán y cols. 2003). Esto se hace patente al determinar la sensibilidad de los dos componentes de liberación a cambios en la concentración de calcio extracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  (Millán y cols., 2002c). Así, el descenso de 1,33 a 0,5 mM en dicha concentración redujo significativamente la liberación inducida por KCl (de  $3,5 \pm 0,1$  a  $2,04 \pm 0,1$  nmol/ mg de proteína,  $\pm$ error típico,  $p$ ;  $n=3$ ,  $p<0,001$ ) (Fig. IV.2A), y completamente la contribución de los canales de calcio de tipo N a la liberación de glutamato, como pone de manifiesto la falta de efecto de  $\omega$ -Conotoxina-GVIA ( $0,03 \pm 0,7\%$ ;  $p=0,9918$ ;  $n=4$ ) así como la completa inhibición de la liberación con  $\omega$ -Agatoxina-IVA ( $102,8 \pm 1,9\%$ ,  $n=4$ ;  $p<0,001$ ) (Fig. IV.2A y B). Otra evidencia del débil acoplamiento de los canales de calcio tipo N a la exocitosis, la obtuvimos realizando los ensayos de liberación de glutamato en presencia de concentraciones crecientes del quelante de calcio BAPTA. BAPTA es un quelante rápido de calcio que compite con la maquinaria exocitótica por el calcio que entra en la terminación nerviosa durante la despolarización (Schneggenburger y Neher, 2005). De acuerdo con esto, BAPTA puede bloquear la liberación de glutamato si la concentración de tampón en la terminación sináptica es suficiente. Así, mientras bajas concentraciones de BAPTA (200nM) no afectaron a ninguno de los dos componentes de liberación, ni el sensible a  $\omega$ -Aga-IVA ( $98,9 \pm 3,0\%$  respecto al control sin BAPTA,  $n=3$ ;  $p>0,05$ ) ni el sensible a  $\omega$ -CgTx-GVIA ( $105,3 \pm 5,0\%$ ,  $n=3$ ,  $p>0,05$ ) (Fig. 2C), concentraciones más altas del quelante de calcio produjeron una pérdida preferente de la liberación acoplada a los canales de calcio tipo N. Así, BAPTA 5  $\mu\text{M}$  suprimió el componente de liberación asociado a canales N ( $-2,3 \pm 1,0\%$  respecto a su control,  $n=3$ ,  $p<0,001$ ), mientras que aquel asociado a canales de tipo P/Q sólo se redujo parcialmente ( $69,3 \pm 7,0\%$  de su control;  $n=3$ ,  $p<0,05$ ). Ambos componentes de



liberación fueron totalmente suprimidos por una concentración de BAPTA de 50 $\mu$ M (Fig. IV.2C).



**Figura IV. 2. Los canales de calcio del tipo P/Q muestran un mejor acoplamiento a la liberación de glutamato que los canales de calcio del tipo N en terminaciones sinápticas de hipocampo.**

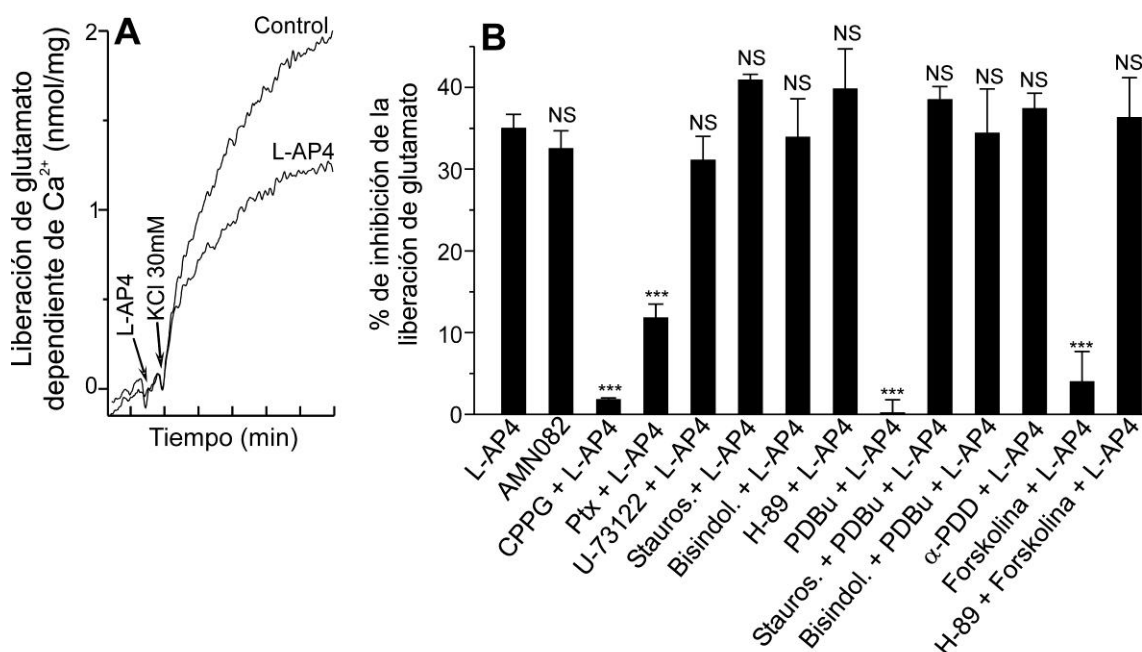
Los sinaptosomas se incubaron durante media hora en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína). La liberación de glutamato dependiente de calcio inducida por KCl 30mM (**A**) y (**B**) se determinó a una  $[Ca^{2+}]_{ext}$  de 0,5 mM. Tanto en presencia como en ausencia (control) de  $\omega$ -CgTx-GVIA (2 $\mu$ M) y de  $\omega$ -Aga-IVA (200nM) añadidas 100 segundos antes de la despolarización. (**B**), Los diagramas de barras representan la magnitud de la liberación acumulada 5 minutos después de la despolarización en las condiciones mostradas en (**A**). (**C**), Muestra el porcentaje de liberación tras el bloqueo de los canales de calcio tipo N y P/Q con  $\omega$ -CgTx-GVIA (componente P/Q, línea continua) y con  $\omega$ -Aga-IVA (componente N, línea discontinua), respectivamente, y tras la preincubación de 30 minutos con diferentes concentraciones de BAPTA-AM. Los resultados representan la media  $\pm$  error típico de 3-4 experimentos llevados a cabo en 3-4 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores en ausencia de las toxinas mediante el test de la *t* de Student: <sup>NS</sup>  $p > 0,05$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 1.3. mGluR7 inhibe la liberación de glutamato asociada a los canales de tipo P/Q por de un mecanismo sensible a PTx e independiente de las actividades de PKC y de PKA.

El hecho de que sólo los canales de calcio de tipo P/Q participen en la liberación inducida por KCl en presencia de una concentración de calcio extracelular de 0,5mM nos proporciona una herramienta idónea para estudiar la modulación que ejerce mGluR7 sobre este tipo de canales de calcio. Bajo estas condiciones, una concentración alta de L-AP4 (1mM) inhibió de manera significativa la liberación de glutamato ( $35,0 \pm 1,7\%$ ,  $n=21$ ,  $p<0,001$  respecto al control sin L-AP4) (Fig. IV.3A). Del mismo modo, el agonista selectivo de mGluR7 AMN082 a una concentración de 0,5  $\mu$ M (Mitsukawa y cols., 2005) redujo la liberación de glutamato en un  $32,5 \pm 2,2\%$ ,  $n=3$ ,  $p<0,001$ ) (Fig. IV.3B). El antagonista de los receptores de glutamato metabotrópicos del grupo III, CPPG (Jane y cols., 1995), suprimió totalmente la inhibición de la liberación de glutamato por L-AP4 ( $1,8 \pm 0,2\%$ ,  $n=5$ ,  $p<0,001$ ) (Fig. IV.3B). Por otro lado, esta inhibición de la liberación se redujo hasta sólo un  $11,8 \pm 1,1\%$  en presencia de la toxina pertúsica (PTx,  $n=7$ ,  $p<0,001$ ) (Fig. IV.3B), lo que sugiere una implicación de proteínas Gi/o en este mecanismo presináptico.

El inhibidor de fosfolipasa C, U-73122, no alteró significativamente la inhibición de la liberación del neurotransmisor ( $31,1 \pm 2,9\%$ ,  $n=5$ ,  $p>0,05$ ) (Fig. 3B), lo que sugiere que PLC no está implicada en este mecanismo de acción de L-AP4. Además, ni el inhibidor de amplio espectro de proteínas quinasas estaurosporina, ni los inhibidores más específicos de PKC y PKA bisindolilmaleimida y H-89 alteraron significativamente la inhibición ejercida por L-AP4 sobre la liberación de glutamato ( $40,9 \pm 0,7\%$ ,  $n=5$ ;  $p>0,05$ ;  $33,9 \pm 4,7\%$ ;  $n=5$ ;  $p>0,05$  y  $39,8 \pm 4,9\%$ ;  $n=10$ ;  $p>0,05$ ; respectivamente, Fig. IV. 3B); descartandose por tanto la participación de estas dos quinasas en la vía de señalización responsable de la inhibición de la liberación. Aunque PKC no media la vía de transducción de señales desencadenada por mGluR7, sí está ampliamente descrito el efecto supresor que la activación de esta quinasas tiene sobre la inhibición presináptica debida a receptores de glutamato metabotrópicos (mGluRs) en sinapsis glutamatérgicas (Swartz y cols., 1993; Herrero y cols., 1996; Macek y cols., 1998). De acuerdo con estos precedentes, observamos que la activación previa de PKC con ésteres de forbol suprimió completamente la inhibición por L-AP4 de la liberación evocada ( $-0,7 \pm 1,6\%$ , de inhibición respecto al control sin L-AP4,  $n=4$ ,  $p<0,001$ ). Esta supresión no se

produjo cuando previamente se inhibió PKC con estaurosporina y bisindolilmaleimida ( $38,5 \pm 1,6\%$ ,  $n=5$ ;  $p>0,05$  y  $34,4 \pm 5,4\%$ ;  $n=4$ ;  $p>0,05$ , respectivamente, Fig. IV. 3B). Del mismo modo, la activación de PKA, tras aumentar los niveles de AMPc con forskolina, hizo desaparecer en su práctica totalidad la inhibición de la liberación de glutamato ejercida por L-AP4 ( $4,0 \pm 3,7\%$  de inhibición respecto al control sin L-AP4,  $n=5$ ,  $p<0,001$ ), siendo este efecto prevenido por el inhibidor de PKA H-89 ( $36,3 \pm 4,9\%$ ,  $n=9$   $p>0,05$ ) (Fig IV. 3B).

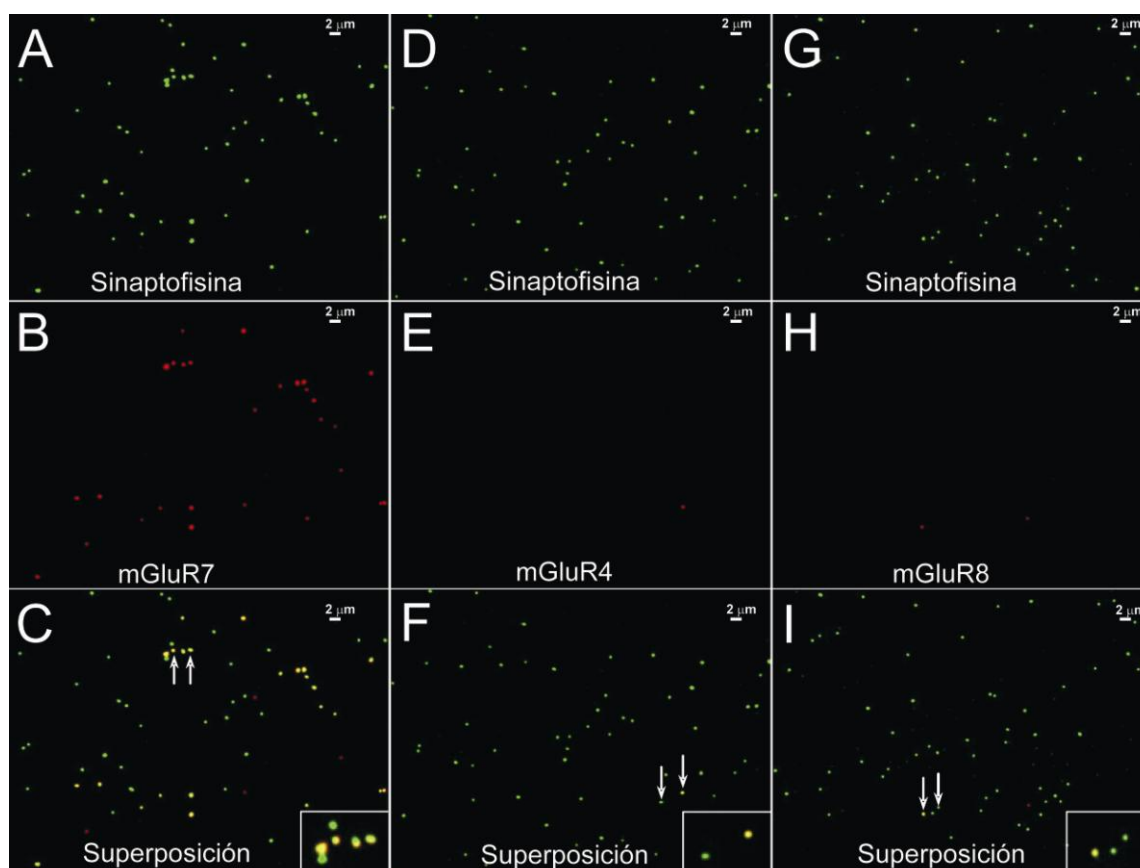


**Figura IV. 3. Caracterización farmacológica de la inhibición ejercida por L-AP4 sobre la liberación de glutamato acoplada a los canales de calcio del tipo P/Q en botones sinápticos de hipocampo.**

Los sinaptosomas se incubaron con adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína) durante 30 min. (A), La liberación de glutamato dependiente de calcio inducida por KCl 30 mM fue determinada en presencia de  $[Ca^{2+}]_{ext}$  0,5mM y tanto en presencia como en ausencia (control) de L-AP4 (1mM), añadido 30 segundos antes de la despolarización. (B), Porcentaje de inhibición de la liberación de glutamato dependiente de calcio. El agonista selectivo de mGluR7 AMN082 (0,5 $\mu$ M) fue añadido 30 segundos antes de la despolarización. El antagonista de los receptores mGluR del grupo III CPPG (100 $\mu$ M) se añadió 10 segundos antes que el agonista L-AP4. En los experimentos con toxina pertúsica (Ptx + L-AP4), los sinaptosomas se preincubaron durante 2 horas con la toxina (1,5 $\mu$ g/ml). Los inhibidores de proteínas quinasas estaurosporina a 100nM (Stauros.+L-AP4), bisindolilmaleimida a 1 $\mu$ M (Bisindol.+L-AP4) y H-89 a 10 $\mu$ M (H-89+L-AP4) fueron todos ellos añadidos 30 minutos antes del ensayo de liberación, de igual modo se procedió con el inhibidor de PLC U-73122 (2 $\mu$ M). El éster de forbol PDBu (1 $\mu$ M) se añadió 10 segundos antes del agonista L-AP4 (PDBu+L-AP4) sólo o tras la incubación durante media hora de los sinaptosomas con estaurosporina 100nM (Stauros.+PDBu+L-AP4) o con bisindolilmaleimida 1 $\mu$ M (Bisindol.+PDBu+L-AP4). El éster de forbol inactivo  $\alpha$ -PDD fue añadido a 1 $\mu$ M 10 segundos antes que el L-AP4 ( $\alpha$ -PDD+L-AP4). Forskolina (100 $\mu$ M) se añadió tanto a los sinaptosomas no tratados (Forskolina+L-AP4) como a los tratados durante media hora con H-89 10  $\mu$ M (H-89+Forskolina+L-AP4). Los resultados expresan la media  $\pm$  error típico de 5-21 experimentos llevados a cabo sobre 5-21 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con el control (% de inhibición de la liberación por L-AP4) mediante el test de la *t* de Student: NS  $p>0,05$  y \*\*\* $p<0,001$ .

#### **1.4. mGluR7 es el único receptor sensible a L-AP4 que se expresa en terminaciones sinápticas de hipocampo de rata adulta.**

La baja afinidad por el agonista L-AP4 de los receptores metabotrópicos de glutamato que median la inhibición de la liberación en terminaciones nerviosas de hipocampo parece indicar que se trata de mGluR7. Hecho éste que se ve confirmado por la inhibición que ejerce sobre la liberación de glutamato el agonista específico de mGluR7, AMN082. No obstante, para identificar de forma inequívoca el tipo de receptor responsable de la inhibición de la liberación se determinó mediante inmunocitoquímica la distribución de los receptores del grupo III que se expresan en el cerebro, mGluR7, 4 y 8. Los sinaptosomas se fijaron sobre cubreobjetos tratados con polilisina y se marcaron doblemente con un anticuerpo frente a la proteína vesicular sinaptofisina y con anticuerpos contra mGluR7, 4 y 8. Los resultados indican que el  $37,8 \pm 1,5\%$  de las partículas que resultaron positivas para sinaptofisina (587 partículas procedentes del análisis de 8 campos) lo fueron también para mGluR7a (media  $\pm$  error típico, Fig. IV. 4, A-C), mientras que sólo un  $2,1 \pm 0,3\%$  (de 642 partículas de 8 campos, Fig5., D-F) y un  $2,3 \pm 0,4\%$  (de 702 partículas de 8 campos, Fig. IV. 4, G-I) lo fueron para mGluR4 y mGluR8, respectivamente. Estos resultados corroboran las evidencias obtenidas en los experimentos funcionales de liberación de glutamato, que la respuesta a L-AP4 en esta preparación de sinaptosomas de botones sinápticos de hipocampo de rata adulta está mediada principalmente por mGluR7.

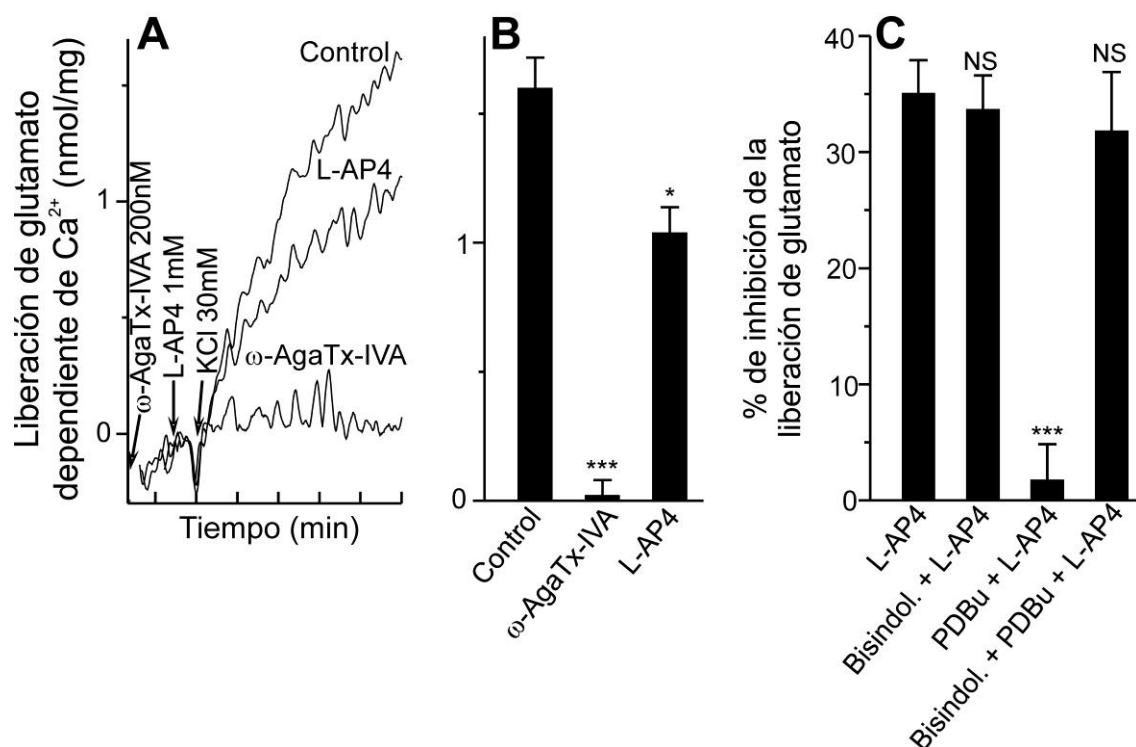


**Figura IV. 4. mGluR7 es el único receptor mGluR del grupo III que se expresa en abundancia en la preparación de sinaptosomas de hipocampo de rata adulta.**

Los sinaptosomas de hipocampo de rata se incubaron (2 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) a 37°C durante 1 hora; para después ser fijados sobre cubreobjetos tratados con polilisina y teñidos con anticuerpos contra mGluR7a, 4a, y 8a, y frente al marcador vesicular sinaptofisina. La localización de los anticuerpos se visualizó con los anticuerpos secundarios marcados con los fluróforos Cy2 para sinaptofisina (A, D y G) y Cy3 para mGluR7a, 4a, y 8a (B, E y H). C, F e I muestran la superposición de sinaptofisina y cada uno de los receptores, los cuadros insertados en la zona inferior derecha muestran más amplificadas las regiones indicadas por las flechas. La barra corresponde a una escala de 2  $\mu$ M. Para cada doble experimento inmunocitoquímico se analizaron 10-18 campos obtenidos de 4-6 preparaciones de terminales sinápticos. De entre las partículas que resultaron inmunopositivas para sinaptofisina,  $37,8 \pm 1,5\%$ ;  $2,1 \pm 0,3\%$ ;  $2,3 \pm 0,4\%$  expresaron mGluR7a, mGluR4a, y mGluR8a, respectivamente.

### 1.5. L-AP4 también inhibe la liberación de glutamato acoplada a canales de calcio de tipo P/Q en botones sinápticos de cerebelo de ratón.

La inhibición de mGluR7 sobre la liberación acoplada a canales de calcio de tipo N y P/Q en terminaciones nerviosas de corteza cerebral e hipocampo, respectivamente (Millán y cols., 2002a) es independiente de la actividad de PKC. Sin embargo, esta quinasa parece estar involucrada en la inhibición de canales de calcio de tipo P/Q somáticos de células granulares (Perroy y cols., 2000). Con el fin de determinar si la implicación de PKC es una característica propia de la señalización de mGluR7 en el cerebelo, se realizaron experimentos con sinaptosomas de terminaciones sinápticas de cerebelo. Dado que el cerebelo de ratón presenta una expresión de mGluR7 mucho más abundante que el de rata (Kinoshita y cols., 1998), los experimentos de liberación de glutamato se hicieron en una preparación de sinaptosomas de cerebelo de ratón. Además, estos ensayos se realizaron siempre en presencia de adenosina desaminasa para evitar un posible tono inhibitorio de adenosina. En estas condiciones, la liberación que induce KCl a una concentración extracelular de calcio de 0,5mM ( $1,59 \pm 0,1$ nmol,  $n=3$ ) fue totalmente suprimida por  $\omega$ -Agatoxina-IVA ( $102,8 \pm 3,1\%$  de inhibición respecto al control sin toxina,  $n=3$ ,  $p<0,001$ ) poniendo de manifiesto el exclusivo control que los canales de calcio de tipo P/Q ejercen sobre la liberación de glutamato en estas condiciones. Al igual que se observó en botones sinápticos de hipocampo, la liberación de glutamato no se redujo a bajas concentraciones de L-AP4 (20 $\mu$ M) ( $2,6 \pm 2,5\%$ ,  $n=3$ ,  $p>0,05$ , datos no mostrados), pero sí a concentraciones altas (1mM) ( $35,1 \pm 2,9\%$  de inhibición respecto al control sin L-AP4,  $n=4$ ,  $p<0,05$ ) (Fig. IV. 5A y B). Como ocurría también en la preparación de sinaptosomas de hipocampo, dicha inhibición no se vio afectada por el inhibidor de PKC bisindolilmaleimida ( $33,7 \pm 3,0\%$ ,  $n=4$ ,  $p>0,05$ ), mientras que fue totalmente suprimida por la activación de esta quinasa con el éster de forbol PDBu ( $1,7 \pm 3,1\%$ ,  $n=7$ ,  $n=7$ ,  $p<0,001$ ) (Fig. IV. 5C). A la vista de estos resultados, podemos concluir que, en los botones sinápticos de cerebelo, mGluR7 inhibe el componente de liberación asociado a los canales de calcio del tipo P/Q mediante un mecanismo independiente de PKC.



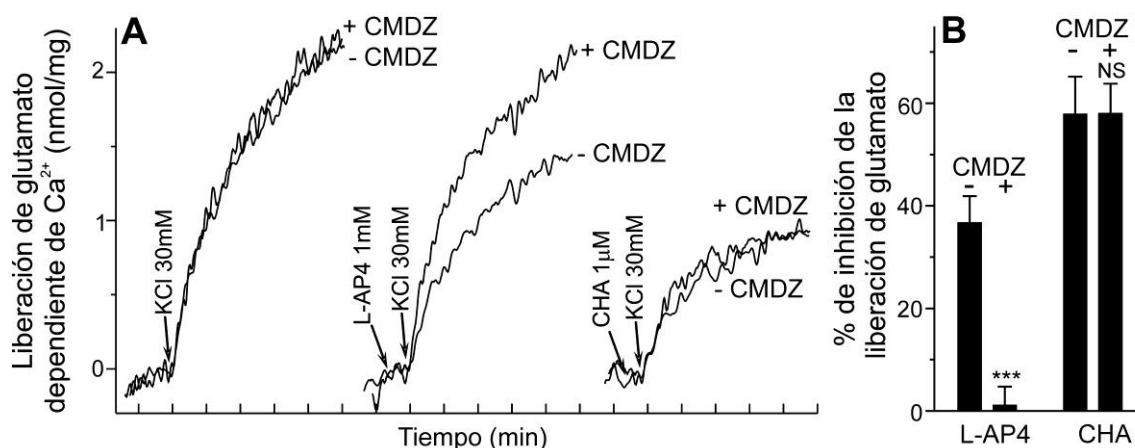
**Figura IV. 5. Las altas concentraciones L-AP4 inhiben el componente de la liberación acoplado a los canales de calcio de tipo P/Q en botones sinápticos de cerebelo de ratón.**

Los sinaptosomas de cerebelo de ratones  $+/+$  adultos (3-5 meses) se incubaron en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína) durante 30 min. 1 ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato. **A**, La liberación de glutamato dependiente de calcio en presencia de  $[Ca^{2+}]_{ext}$  0,5mM fue reducida por L-AP4 (1mM, añadido 30 segundos antes de la despolarización) y suprimida en su totalidad por  $\omega$ -Aga-IVA (200nM), 100 segundos antes de despolarizar). **B**, El diagrama de barras muestra la magnitud de la liberación de glutamato dependiente de calcio tras 5 minutos de despolarización en ausencia (control) y presencia de  $\omega$ -Aga-IVA (200nM) o L-AP4 (1mM). **C**, Los diagramas de barras representan el porcentaje de inhibición tras la adición de L-AP4 (1mM) tanto en sinaptosomas no tratados (L-AP4) como en sinaptosomas preincubados durante media hora con bisindolilmaleimida 1 $\mu$ M (Bisindol.+L-AP4). El éster de forbol PDBu (1 $\mu$ M, añadido 10 segundos antes que L-AP4) sólo (PDBu+L-AP4) o tras la incubación de los sinaptosomas durante media hora con el inhibidor de PKC bisindolilmaleimida (1 $\mu$ M) (Bisindol.+PDBu+L-AP4). Los resultados son la media  $\pm$  error típico de 3-7 experimentos llevados a cabo en 3-7 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores control (panel B) o con el % de inhibición por L-AP4 (panel C) mediante el test de la  $t$  de Student: <sup>NS</sup>  $p > 0,05$ ; \* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$ .

### 1.6. Calmodulina participa en la inhibición del componente P/Q de la liberación de glutamato por mGluR7.

La interacción entre  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina y el extremo carboxilo terminal de mGluR7 es importante para la inhibición presináptica de la liberación de glutamato en autapsis de hipocampo y en terminaciones nerviosas de corteza cerebral (O'Connor y cols., 1999; Millán y cols., 2002a) pero no para la modulación que mGluR7 ejerce sobre las corrientes mediadas por canales GIRK (Sorensen y cols., 2002). Para determinar si dicha interacción con calmodulina es necesaria en la respuesta de mGluR7 en los botones sinápticos de hipocampo se estudiaron los efectos del antagonista de calmodulina, calmidazolium. Calmidazolium ( $1\mu\text{M}$ ) no modificó la liberación de glutamato inducida por KCl ( $2,16\pm 0,13$  y  $2,12\pm 0,1$  nanomoles en ausencia y en presencia de la droga, respectivamente;  $n=3$ ;  $p>0,05$ ; Fig. IV. 6A). Sin embargo, el antagonista de calmodulina eliminó ( $1,1\pm 3,6\%$ ;  $n=5$ ;  $p<0,01$ ) la inhibición de la liberación de glutamato inducida por L-AP4 ( $36,7\pm 5,2\%$ ;  $n=3$ ). Por el contrario, como ya se había descrito en autapsis de hipocampo (O'Connor y cols., 1999), el antagonista de calmodulina no afectó ( $58\pm 5,8\%$ ;  $n=5$ ;  $p>0,05$ ) la inhibición de la liberación del agonista del receptor de adenosina  $A_1$ , ciclohexiladenosina, ( $57,9\pm 7,3\%$ ;  $n=3$ ) (Figuras IV. 6A y B).



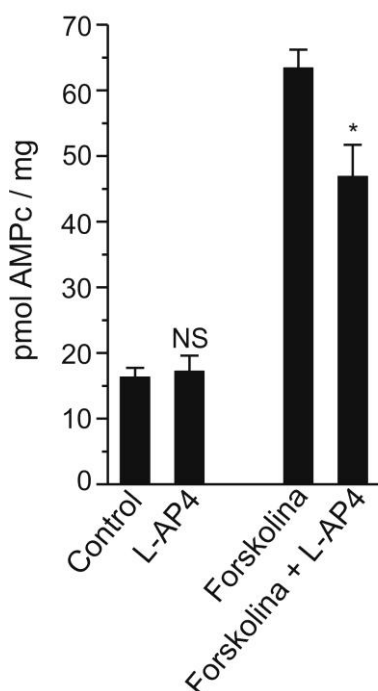


**Figura IV. 6. El antagonista de calmodulina, calmidazolium, previene la inhibición de la liberación de glutamato por L-AP4.**

Los sinaptosomas de hipocampo de ratas se incubaron durante media hora en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína). **(A)**, Liberación de glutamato dependiente de calcio fue determinada en presencia de  $[Ca^{2+}]_{ext}$  0,5 mM tanto en sinaptosomas control como en sinaptosomas preincubados con calmidazolium 1μM los últimos 30 minutos previos a la despolarización. L-AP4 (1mM) y CHA (1μM) fueron añadidos 30 segundos antes de despolarizar. **B**, Los diagramas de barras muestran el porcentaje de inhibición de la liberación por L-AP4 y CHA en sinaptosomas control y en sinaptosomas tratados con calmidazolium. Los resultados son la media  $\pm$  error típico de 3-5 experimentos realizados en 3-5 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores en ausencia de agonistas mediante el test de la *t* de Student: <sup>NS</sup> $p > 0,05$  y <sup>\*\*\*</sup> $p < 0,001$ .

### 1.7. La inhibición de la liberación de glutamato mediada por mGluR7 no se debe a una disminución de los niveles intracelulares de AMPc.

Está ampliamente descrita la capacidad de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III de reducir la actividad adenilato ciclasa y los niveles de AMPc tanto en sistemas de expresión heteróloga como en preparaciones neuronales (Okamoto y cols., 1994; Herrero y cols., 1996; Millán y cols., 2002a). Para determinar si la disminución de AMPc es responsable de la inhibición de la liberación de glutamato, se midieron los niveles intrasinaptosomales de AMPc. Los niveles basales de AMPc ( $16,3 \pm 1,4$  pmol/mg. de proteína  $\pm$  SEM,  $n=3$ ) no se modificaron con L-AP4 (1mM) ( $17,2 \pm 2,4$ ;  $n=3$ ;  $p > 0,05$ ; Fig. IV. 7) lo que descarta que la inhibición de la liberación mediada por mGluR7 esté causada por un descenso en los niveles de AMPc.

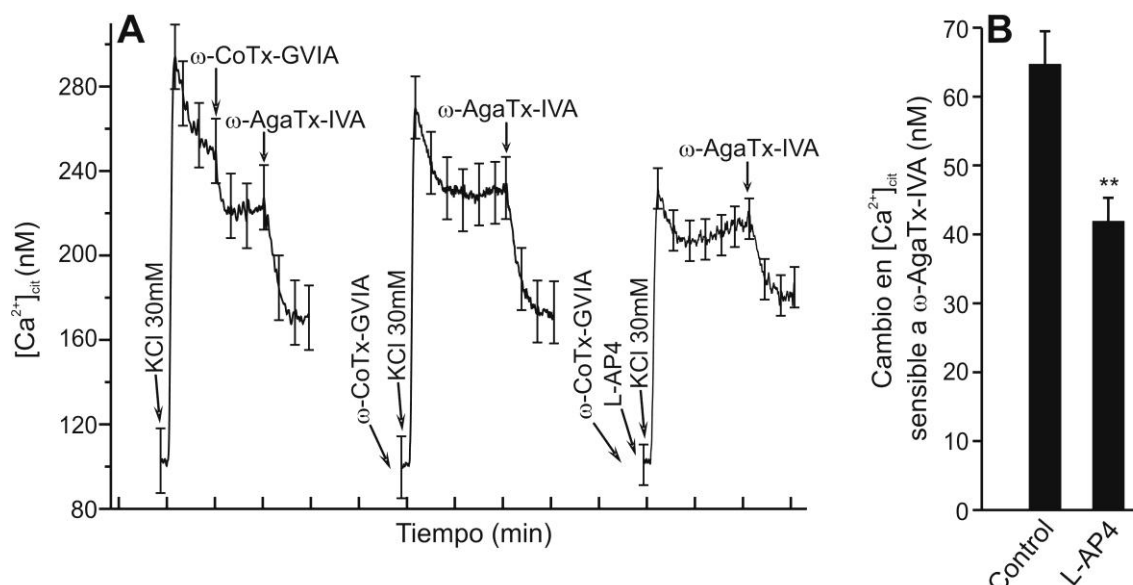


**Figura IV. 7. L-AP4 reduce los niveles de AMPc en presencia pero no en ausencia de forskolinina.**

Los sinaptosomas de hipocampo de rata se incubaron (2 mg/ml) en un medio HBM con BSA (1 mg/ml) a 37°C durante 30 minutos en presencia de  $\text{CaCl}_2$  (1,33 mM), adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína) y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (1 mM). Durante los últimos 5 minutos los sinaptosomas se incubaron con L-AP4 1mM antes de cuantificar el AMPc intracelular mediante técnicas de radioensayo tal y como se describe detalladamente en *Materiales y métodos*. Se consideró el nivel de AMPc endógeno en ausencia de L-AP4 como valor control. La forskolinina fue añadida (100 $\mu$ M) 15 minutos antes de la medida de AMPc tanto en ausencia como en presencia de L-AP4. Los resultados representan la media  $\pm$  error típico de 3-5 experimentos realizados en 3 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores en ausencia de L-AP4 mediante el test de la *t* de Student: <sup>NS</sup>  $p > 0,05$  y \*  $p < 0,05$ .

### 1.8. mGluR7 reduce la entrada de calcio mediada por canales de calcio de tipo P/Q.

La inhibición de la liberación de glutamato inducida por mGluR7 podría estar relacionada con una disminución de la entrada de calcio por los canales de tipo P/Q. Con el fin de examinar esta posibilidad, se midieron los cambios en la concentración de calcio citoplásmico libre ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ ) en terminaciones sinápticas cargadas con el indicador de calcio fura-2. La adición de KCl produjo un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  que fue en parte transitorio cayendo hasta estabilizarse después de un minuto. Este incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  hasta la meseta (139,7 $\pm$ 15,3 nM, n=4) se redujo con  $\omega$ -Conotoxina-GVIA hasta 117,7 $\pm$ 9,4 nM (n=4) ( $p > 0,05$ ) y hasta 62,9 $\pm$ 6,3nM (n=4) con  $\omega$ -Agatoxina-IVA (Fig. IV. 8A). Para aislar el efecto de mGluR7 sobre la entrada de calcio mediada por canales de tipo P/Q, se bloquearon los canales de tipo N con  $\omega$ -CgTx-GVIA. En estas condiciones,  $\omega$ -Agatoxina-IVA redujo la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  64,7 $\pm$ 4,8 nM (n=6,  $p < 0,01$ ), sin embargo, esta respuesta se ocluyó parcialmente (41,9 $\pm$ 6,1nM; n=5;  $p < 0,01$ ) en presencia de L-AP4 (Figuras IV. 8A y B). Por tanto, mGluR7 reduce la entrada de calcio mediada por canales de tipo P/Q.



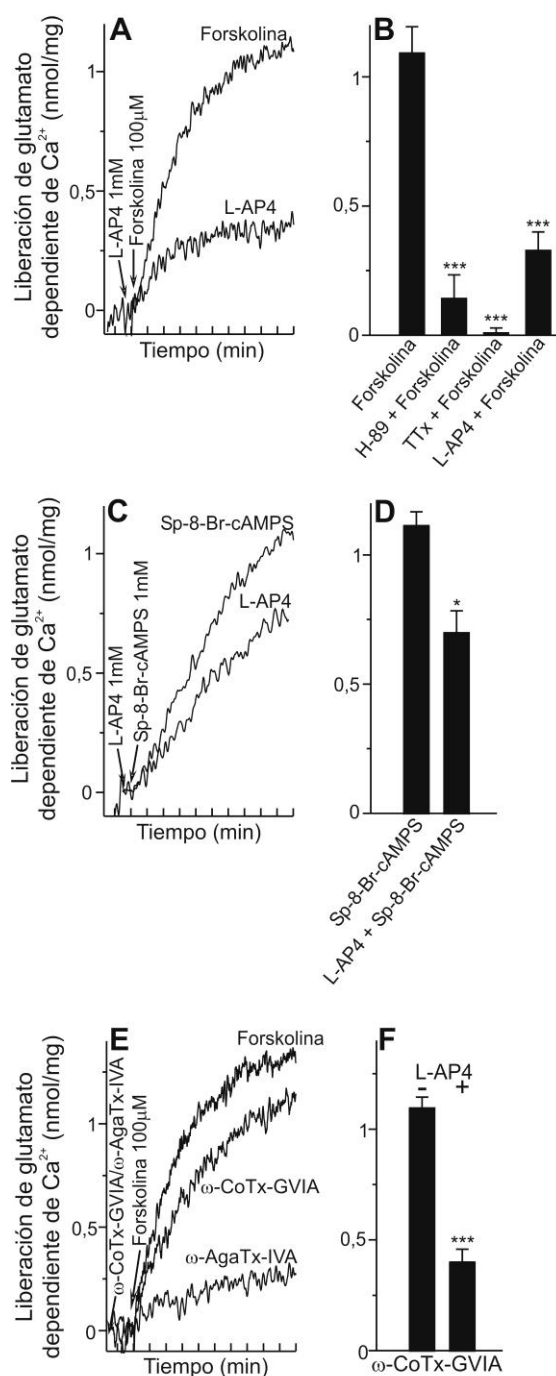
**Figura IV. 8. L-AP4 reduce la entrada de calcio mediada por canales de calcio de tipo P/Q en botones sinápticos de hipocampo de rata.**

Los sinaptosomas se resuspendieron (2mg/ml) en un medio HBM con BSA (1mg/ml), y se incubaron con fura 2-AM (5μM) durante media hora en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína) y  $\text{Ca}^{2+}$  2,66mM, seguidamente se lavaron y resuspendieron (0,67 mg/ml) antes del ensayo. **A**, Incremento en  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  inducido por KCl 30 mM en presencia de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  1,33mM y en presencia de ω-CgTx-GVIA (2μM) y ω-Aga-IVA (200nM) añadidas al minuto y a los 2 minutos tras la despolarización, respectivamente (primer registro). En los otros dos registros, ω-CgTx-GVIA se añadió 40 segundos antes que KCl, mientras que y ω-Aga-IVA se añadió nuevamente 2 minutos después de la despolarización. En el último registro se añadió también L-AP4 (1mM) 30 segundos antes que KCl. **B**, El diagrama de barras representa el cambio en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  (nM) mediado por canales de calcio sensibles a ω-Aga-IVA tanto en presencia como en ausencia de L-AP4. Los resultados representan la media ± error típico de 4-6 experimentos realizados en 4-6 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores en ausencia de L-AP4 mediante el test de la *t* de Student: \*\*  $p < 0,01$ .

### 1.9. La reducción de AMPc inducida por mGluR7 afecta a la modulación de la liberación espontánea mediada por canales P/Q.

Aunque los niveles de AMPc no se alteran a las condiciones en que L-AP4 inhibe la liberación inducida por KCl, es posible que esta vía sólo contribuya a la inhibición de la liberación cuando los niveles de AMPc estén elevados, como sucede en presencia de forskolina ó tras la activación de receptores acoplados a proteínas  $G_s$  (Millán y cols., 2002a). En efecto, el incremento producido por forskolina (100μM) en los niveles de AMPc en terminaciones nerviosas de hipocampo fue menor en presencia de L-AP4 (desde  $17,2 \pm 2,4$  hasta  $46,9 \pm 4,8$  pmol/mg de proteína,  $\pm$ SEM,  $n=3$ ,  $p < 0,05$ ) que en su ausencia (desde  $16,3 \pm 1,4$  hasta  $63,4 \pm 2,8$ ;  $n=3$ ;  $p < 0,001$ ) como se muestra en la figura IV. 7. Es posible, por tanto, que el descenso de AMPc producido por L-AP4 actúe como freno a la facilitación resultante de la activación de la vía de

señalización dependiente de AMPc y PKA en las sinapsis glutamatérgicas (Weisskopf y cols., 1994; Herrero y cols., 1996). Para estudiar con más detalle esta posibilidad, se realizaron experimentos en los que se indujo un incremento en la liberación espontánea de glutamato con forskolina ( $1,1 \pm 0,1$  nmol. por mg. de proteína,  $n=5$ ). Este incremento se redujo con el inhibidor de PKA, H-89 ( $85,5 \pm 8,9\%$  de inhibición respecto al control sin H-89,  $n=4$ ,  $p<0,001$ ) y se suprimió con el bloqueante de canales de sodio tetrodotoxina ( $99,3 \pm 2,1\%$ ;  $n=4$ ;  $p<0,001$ ) (Fig. IV. 9A y B), indicando que dicho incremento en la liberación es el resultado de la inducción de potenciales de acción sensibles a TTx por activación de la vía AMPc/PKA. El incremento de liberación con forskolina también se redujo con L-AP4 ( $69,9 \pm 4,6\%$ ;  $n=10$ ;  $p<0,001$ ) (Fig. IV. 9B). Cabe por tanto pensar que, si la supresión de la liberación espontánea inducida por L-AP4 es el resultado de la inhibición de la actividad adenilil ciclasa y del consiguiente descenso de AMPc, es de esperar que la acción de L-AP4 resulte atenuada cuando la liberación espontánea se induce por activación directa de PKA mediante el análogo de AMPc Sp-8-Br-cAMPS sin activar la adenilato ciclasa. Así, la exposición a Sp-8-Br-cAMPS indujo un incremento en la liberación de glutamato ( $1,1 \pm 0,1$  nmol/mg,  $n=3$ ) comparable al inducido por forskolina ( $p>0,05$ ) (Fig. IV. 9C y D) que, sin embargo, fue reducido en menor medida por L-AP4 ( $37,3 \pm 7,8\%$ ;  $n=5$ ;  $p<0,05$ ), confirmando que la inhibición de la adenilato ciclasa es importante en esta respuesta de L-AP4. Los experimentos con forskolina se realizaron en concentraciones extracelulares de calcio de  $1,33$  mM, cabe pensar por tanto, que en esta liberación participan los canales de calcio de los tipos N y P/Q. Efectivamente, la adición de  $\omega$ -CgTx-GVIA redujo la liberación marginalmente ( $17,8 \pm 4,9\%$ ,  $n=5$ ,  $p<0,05$ ) mientras  $\omega$ -Aga-IVA la redujo en mayor grado ( $83,7 \pm 3,1\%$ ,  $n=5$ ,  $p<0,001$ ) (Fig. IV. 9E). Con el fin de estudiar si L-AP4 reducía, en efecto, el componente de la liberación espontánea asociado a los canales de calcio de tipo P/Q, los experimentos de liberación espontánea se realizaron en presencia de  $\omega$ -CgTx-GVIA evitando así la contribución de los canales de tipo N. En estas condiciones, L-AP4 redujo la liberación espontánea en un  $63,6 \pm 3,6\%$  ( $n=5$ ,  $p<0,001$ ) (Fig. IV. 9F), lo que indica que, el descenso en los niveles de AMPc originado por mGluR7 es, por tanto, capaz de modular el componente de la liberación espontánea asociado a la actividad de los canales de calcio de tipo P/Q.



**Figura IV. 9. L-AP4 redujo el componente P/Q de la liberación espontánea por inhibición de la adenilato ciclasa.**

Los sinaptosomas de hipocampo de rata adulta se incubaron 30 min. en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína) para, a continuación, determinar la liberación de glutamato inducida por forskolina 100 μM (A) o por Sp-8-Br-cAMPS 1 mM (C) a una  $[Ca^{2+}]_{ext}$  de 1,33 mM. Los diagramas de barras B y D representan la magnitud de la liberación espontánea de glutamato (media  $\pm$  error típico,  $n=4-10$ ) inducida por forskolina o Sp-8-Br-cAMPS (Sp) durante 10 minutos. En los experimentos con H-89, los sinaptosomas fueron preincubados con el inhibidor de PKA (10 μM) durante media hora (H-89+Forsk). La tetrodotoxina (1 μM) se añadió 1 minuto antes de la forskolina (TTx+Forsk). L-AP4 (1 mM) fue añadido 30 segundos antes que forskolina o Sp-8-Br-CAMPS. E, Liberación de glutamato inducida por forskolina en presencia de  $\omega$ -CgTx-GVIA (2 μM) o  $\omega$ -AgaTx-IVA (200 nM) añadidas 100 s. antes que forskolina. F, El diagrama de barras muestra la reducción por L-AP4 (1 mM) de la liberación inducida por forskolina en presencia de  $\omega$ -CgTx-GVIA (2 μM). La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores con forskolina (panel B) o con los valores en ausencia de L-AP4 (panel D y F) mediante el test de la *t* de Student: \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,001$ .

## **2. La inhibición de la liberación mediada por mGluR7 tiene lugar en botones sinápticos que también expresan receptores GABA<sub>B</sub> y adenosina A<sub>1</sub>.**

En las sinapsis del sistema nervioso central la liberación de neurotransmisores se inicia por la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje. La liberación de glutamato depende fundamentalmente de los canales de calcio de tipo P/Q y N (Luebke y cols., 1993; Mintz y cols., 1995; Turner y Dunlap, 1995; Vázquez y Sánchez-Prieto, 1997), distribuidos heterogéneamente en las terminaciones nerviosas. De este modo, mientras que, en algunos botones la liberación de neurotransmisores sólo recae en canales de tipo N o P/Q, en otros, ambos subtipos contribuyen a la liberación (Millán y cols., 2002b; Reid y cols., 2003). Se ha observado que, durante el desarrollo, se pasa de una situación en la que diversos tipos de canales (canales P/Q, N y R) controlan la transmisión sináptica, a una situación en la que un solo tipo de canal controla prácticamente toda la liberación de neurotransmisores (Wu y cols., 1999; Iwasaki y cols., 2000; González-Inchauspe y cols., 2007). No obstante, en la corteza cerebral de animales adultos, una fracción sustancial de la liberación de glutamato permanece controlada por canales N (Vázquez y Sánchez-Prieto, 1997; Iwasaki y cols., 2000; Millán y cols., 2002a, 2003). Además, mediante estudios de imagen de calcio en terminaciones sinápticas individuales, se ha observado que los canales calcio de tipo N y P/Q se encuentran segregados en la rata adulta y se expresan en diferentes subpoblaciones de terminales nerviosos (Millán y cols., 2003). Esta separación entre botones con canales N y botones con canales P/Q podría conferir propiedades diferenciales a las sinapsis ya que los sitios de liberación controlados por canales de tipo N y P/Q presentan distintas propiedades, incluyendo su modulación por receptores de glutamato acoplados a proteínas G (Zhang y cols., 1996; Currie y Fox., 1997; González-Inchauspe y cols., 2007).

Está descrito que receptores acoplados a proteínas G, GPCRs, tales como el receptor de adenosina A<sub>1</sub>, de GABA<sub>B</sub> o el receptor de glutamato mGlu7, inhiben la transmisión sináptica excitadora (Wu y Saggau, 1994, 1995) y que estos receptores ponen en marcha vías de señalización acopladas de forma negativa a la actividad de los canales de calcio y a la adenilato ciclasa (Yawo y Chuhma, 1993; Millán y cols., 2002a, 2003; Pelkey y cols., 2006). Es conocido que las terminaciones sinápticas de corteza cerebral expresan receptores mGlu7, con una baja afinidad por el agonista L-AP4 (Okamoto y cols., 1994) y cuya activación inhibe la liberación de glutamato (Gereau y Conn, 1995; Macek y

cols., 1998; Millán y cols., 2002a, 2003; Capogna, 2004; Pelkey y cols., 2006; Ladera y cols., 2007). Recientemente, combinando experimentos de inmunocitoquímica e imagen de calcio en botones individuales, se ha descrito que los receptores  $A_1$ ,  $GABA_B$  y  $mGlu7$  coexisten en una subpoblación de botones sinápticos de corteza cerebral de rata adulta y que comparten las vías de señalización intracelulares responsables de la inhibición de la liberación, lo que posibilita la integración de sus respuestas. De esta manera, la co-adición de los agonistas de los receptores  $mGlu7$ , adenosina  $A_1$  y  $GABA_B$  inhibe la liberación de glutamato inducida por la activación de adenilato ciclasa con forskolina a concentraciones que no tienen efecto cuando se aplican individualmente, sin embargo, cuando los tres receptores se estimulan con concentraciones de agonista altas, tiene lugar una clara oclusión de sus respuestas (Ladera y cols., 2007). Esta oclusión de respuestas inhibitoras de los receptores  $GABA_B$ , adenosina  $A_1$  y  $mGluR$  del grupo III también se ha observado en las sinapsis del cáliz de Held (Kimura y cols., 2003; Takahashi y cols., 2004). Parece probable que la coexpresión de estos receptores tenga lugar en terminaciones con canales de calcio de tipo N, ya que el bloqueo de estos canales con la toxina específica  $\omega$ -conotoxina-GVIA suprime la inhibición de la liberación de glutamato mediada por los receptores  $mGluR7$ ,  $GABA_B$  y  $A_1$  (Ladera y cols., 2007). En el mismo sentido apunta el hecho de que los receptores acoplados a proteínas G inhiban preferentemente canales de calcio de tipo N (Zhang y cols., 1996; Currie y Fox, 1997; González-Inchauspe y cols., 2007).

Con estos precedentes, parece interesante determinar si la oclusión de las respuestas inhibitoras iniciadas por los receptores  $A_1$ ,  $GABA_B$  y  $mGlu7$  tiene lugar preferentemente en botones sinápticos que expresan canales de calcio de tipo N. Para ello, hemos preparado sinaptosomas de ratones carentes de la subunidad  $\alpha_{1B}$  de este tipo de canales de calcio (ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$ ) (Ino y cols., 2001). A diferencia de los ratones que carecen de canales de calcio de tipo P/Q, que mueren a las dos o tres semanas de vida (Jun y cols., 1999), los ratones que carecen de canales N presentan un fenotipo sin alteraciones aparentes y una expectativa de vida normal (Ino y cols., 2001), lo que podría explicarse por la compensación con canales de calcio de tipo P/Q ya que se ha observado un aumento en la expresión de la subunidad principal de los canales de calcio de tipo P/Q en la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo de estos ratones que carecen de canales N (Takahashi y cols., 2004). La pérdida de los canales del tipo N conlleva, no obstante, algunos cambios fenotípicos como son alteraciones en la percepción de los estímulos dolorosos (Kim y cols., 2001; Saegusa y cols., 2002), hiperactividad, alteraciones en el ritmo circadiano y de

la función simpática (Ino y cols., 2001), así como alteraciones de los procesos de plasticidad sináptica a corto (González-Inchauspe y cols., 2007) y a largo plazo (Jeon y cols., 2007), cambios en el comportamiento (Beuckmann y cols., 2003; Nakagawasai y cols., 2010, Kim y cols., 2009) y en el aprendizaje y memoria espaciales (Jeon y cols., 2007).

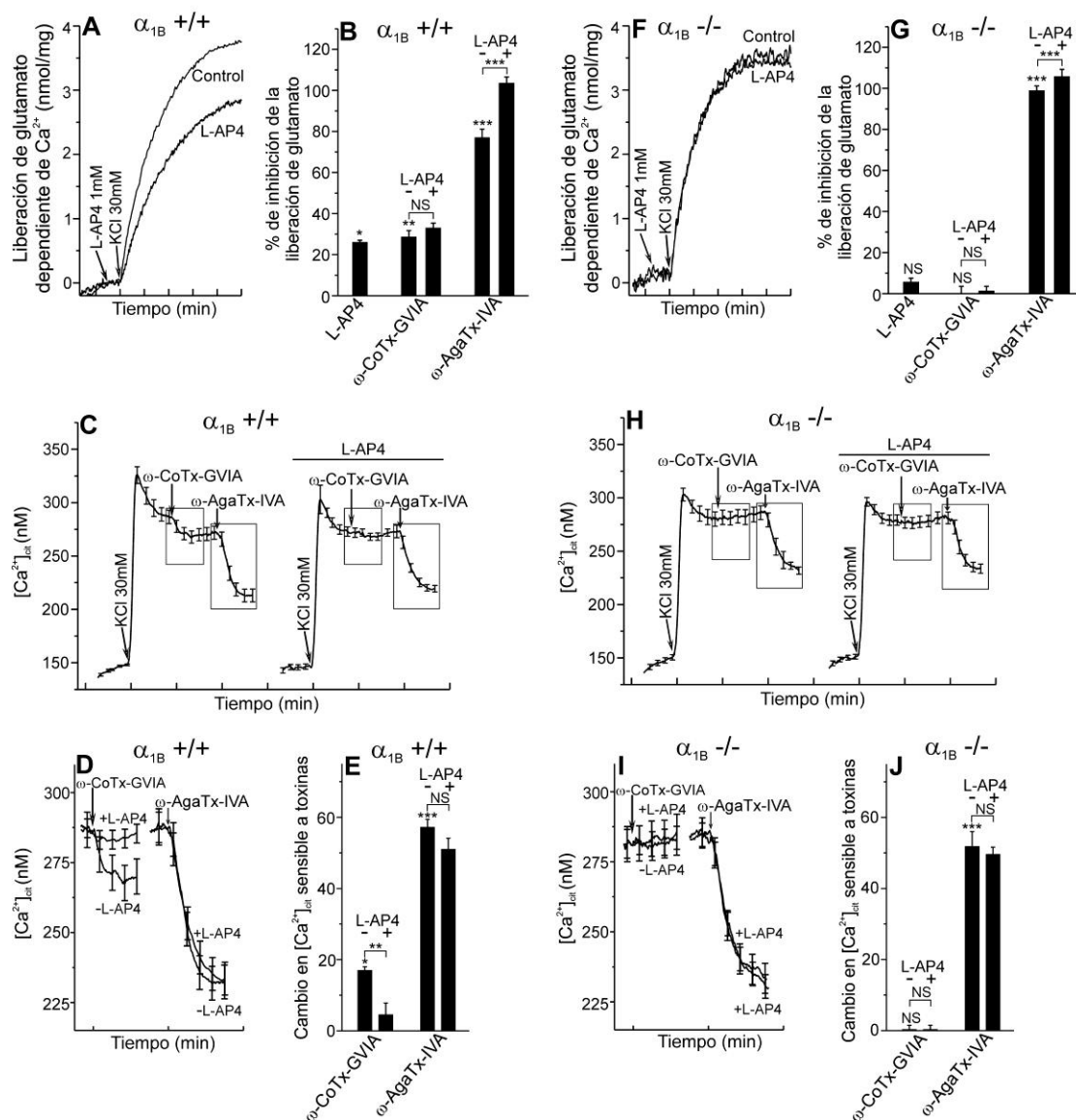
## **2.1. mGluR7 inhibe exclusivamente la liberación de glutamato y la entrada de calcio controladas por canales de calcio de tipo N en terminaciones sinápticas de corteza cerebral de ratón.**

En los sinaptosomas de corteza cerebral de ratones control ( $\alpha_{1B} +/+$ ), la liberación de glutamato inducida con KCl 30 mM ( $3,84 \pm 0,3$  nmol de glutamato por mg. de proteína  $\pm$  error típico,  $n=9$ ) fue reducida por el agonista de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III, L-AP4, en un  $26 \pm 1,0\%$  ( $n=8$ ,  $p<0,05$ ). El bloqueante de canales de calcio de tipo N,  $\omega$ -conotoxina-GVIA, también redujo la liberación en una magnitud similar ( $28,6 \pm 3,1\%$ ,  $n=8$ ,  $p<0,01$ ). Esta última respuesta se ocluyó completamente ( $4,3 \pm 3,9\%$ ;  $n=8$ ;  $p>0,05$ ) por la activación previa de mGluR7 con L-AP4 (Fig. IV. 10A y B). Por el contrario, a pesar de que el bloqueante de canales de calcio de tipo P/Q,  $\omega$ -agatoxina-IVA, produjo una fuerte reducción de la liberación de glutamato ( $77,0 \pm 4,2\%$ ,  $n=7$ ,  $p<0,001$ ), esto no afectó a la inhibición por L-AP4, que se mantuvo en un  $23,0 \pm 5,2\%$  ( $n=6$ ,  $p<0,001$ , Fig. IV. 10A y B). Los cambios en la concentración de calcio libre en el citoplasma ( $[Ca^{2+}]_{cit}$ ) en terminaciones sinápticas cargadas con la sonda fura-2 también apoyaron la conclusión de que mGluR7 inhibe preferentemente el componente de liberación de glutamato asociado a canales de calcio de tipo N. Así, el incremento en la concentración de calcio citosólico libre ( $[Ca^{2+}]_{cit}$ ) inducido por KCl 30 mM se redujo tanto tras la adición de  $\omega$ -conotoxina-GVIA ( $17,0 \pm 1,0$  nM,  $n=7$ ,  $p<0,05$ ) como de  $\omega$ -agatoxina-IVA ( $57,2 \pm 2,2$  nM,  $n=7$ ,  $p<0,01$ ). Sin embargo, L-AP4 ocluyó sólo la respuesta a  $\omega$ -conotoxina-GVIA, que pasó a ser de solo  $4,5 \pm 3,3$  nM ( $n=7$ ,  $p<0,01$ ) mientras que la respuesta a  $\omega$ -agatoxina-IVA permaneció inalterada ( $51,0 \pm 3,1$  nM,  $n=7$ ,  $p>0,05$ , Fig. IV. 10C, D y E). En consecuencia, podemos relacionar la activación de los receptores mGluR7 en terminaciones sinápticas de corteza de ratón con la inhibición de la liberación y de la entrada de calcio mediados por canales de tipo N.

Para confirmar la asociación entre receptores mGlu7 y canales de calcio de tipo N preparamos sinaptosomas de corteza cerebral de ratones que carecen de la subunidad principal ( $\alpha_{1B}$ ) del canal de calcio de tipo N (ratones



$\alpha_{1B}^{-/-}$  (Ino y cols., 2001). En las terminaciones sinápticas de los ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$ , el bloqueo de los canales N con  $\omega$ -conotoxina-GVIA no afectó ni a la liberación de glutamato ( $-2,6 \pm 3,5\%$  de inhibición respecto a al control,  $n=6$ ,  $p>0,05$ ) ni a la entrada de calcio inducida por KCl 30 mM ( $-2,3 \pm 1,2$  nM,  $n=9$ ,  $p>0,05$ ). En cambio, el bloqueante de canales P/Q,  $\omega$ -agatoxina-IVA, suprimió en su totalidad la liberación de glutamato ( $98,9 \pm 2,4\%$ ,  $n=5$ ,  $p<0,001$ ) y redujo considerablemente la entrada de calcio ( $51,8 \pm 4,2$  nM,  $n=7$ ,  $p<0,001$ , fig. IV. 10F-J). Además, en estos ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$ , L-AP4 tampoco modificó ni la liberación de glutamato ( $5,6 \pm 1,9\%$ ,  $n=7$ ,  $p>0,05$ ) ni el cambio en la concentración de el calcio libre citosólico ( $-2,3 \pm 1,2$  nM,  $n=7$ ,  $p>0,05$ ). Por tanto, podemos concluir que, en los botones sinápticos de corteza cerebral de ratón adulto, mGluR7 inhibe específicamente la liberación de glutamato acoplada a canales de calcio de tipo N.



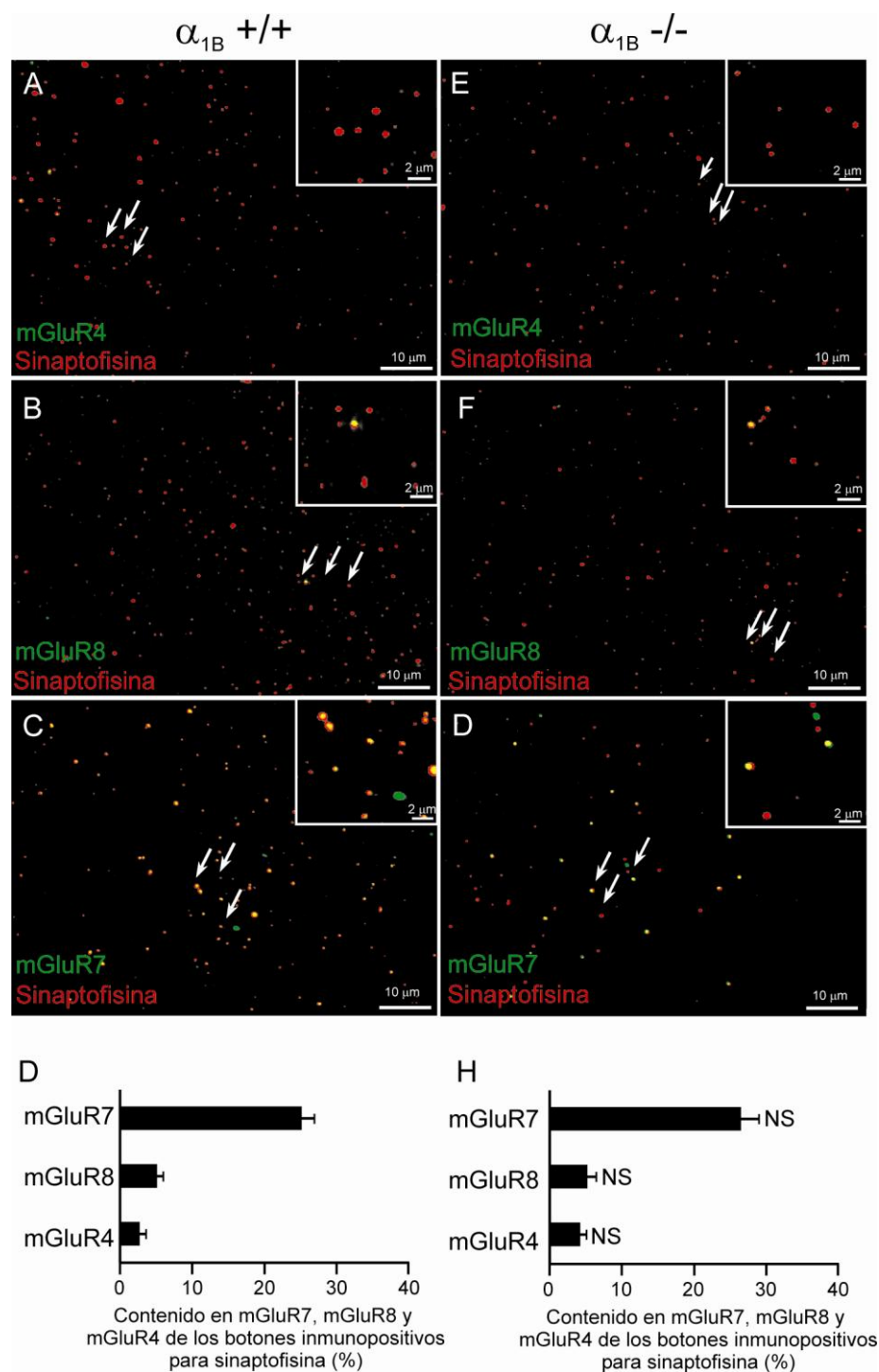
**Figura IV. 10. mGluR7 inhibe exclusivamente el componente de liberación y entrada de  $Ca^{2+}$  controlado por canales N en terminaciones sinápticas de corteza cerebral.**

Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratones adultos se incubaron media hora en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína). La liberación de glutamato inducida con KCl 30 mM en presencia de  $[Ca^{2+}]_{\text{ext}}$  1,33mM, se determinó en terminales de ratones  $\alpha_{1B}^{+/+}$  (A y B) y  $\alpha_{1B}^{-/-}$  (F y G), en presencia y ausencia (control) de L-AP4, y en presencia y ausencia de las toxinas añadidas antes de la despolarización a los tiempos indicados:  $\omega$ -CoTx-GVIA (2 $\mu$ M, 100 s.);  $\omega$ -AgaTx-IVA (200nM, 100 s.) y L-AP4 (1mM, 30 s.). (B y G) Diagramas que representan la liberación acumulada tras 5 min. de despolarización bajo las condiciones mencionadas. El incremento en la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  libre ( $[Ca^{2+}]_{\text{cit}}$ ) inducido con KCl 30 mM en presencia de  $[Ca^{2+}]_{\text{ext}}$  1,33mM se determinó en sinaptosomas de ratones  $\alpha_{1B}^{+/+}$  (C y E) y  $\alpha_{1B}^{-/-}$  (H y J). Las toxinas  $\omega$ -CoTx-GVIA (2 $\mu$ M) y  $\omega$ -AgaTx-IVA (200nM) se añadieron, respectivamente, 1 min. y 2 min. tras la despolarización. L-AP4 1mM se añadió 40 s. antes de la despolarización. (D e I) detalles de las respuestas a  $\omega$ -CoTx-GVIA y  $\omega$ -AgaTx-IVA recuadradas en C y H. (E y J) Diagramas que muestran la magnitud de la entrada de  $Ca^{2+}$  sensible a las toxinas en ausencia y en presencia de L-AP4. Los resultados representan la media  $\pm$  error típico de 7-9 experimentos realizados en 7-9 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores control (ya sea en ausencia de toxinas o en ausencia de L-AP4) mediante el test de la *t* de Student: NS  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 2.2. La expresión de mGluR7 en la corteza cerebral no se altera en los ratones que carecen de canales N.

La falta de modulación por mGluR7 de la liberación de glutamato que tiene lugar en los botones sinápticos de los ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$  podría explicarse tanto por una pérdida de expresión de receptores mGluR7 en los botones sinápticos de estos ratones como por un acoplamiento deficiente del receptor a su vía de señalización. Para resolver esta cuestión, se determinó mediante inmunocitoquímica la expresión de mGluR7 y del resto de receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III presentes en cerebro, tanto en botones sinápticos de ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$  como  $\alpha_{1B}^{+/+}$ .

En la corteza cerebral de ratones  $\alpha_{1B}^{+/+}$ , del total de botones que resultaron inmunopositivos para la proteína de referencia presináptica sinaptofisina (7.856 de 81 campos analizados), el  $25,1 \pm 1,9\%$  también fueron inmunorreactivos para mGluR7a mientras que las proteínas mGluR4a y mGluR8a sólo se expresaron en un  $2,7 \pm 0,9\%$  y  $5,1 \pm 0,9\%$  de los botones, respectivamente (Fig. IV. 11A-D). Por tanto, estos datos están de acuerdo con los resultados de liberación de glutamato que indican que, igual que en sinaptosomas de hipocampo, las respuestas a L-AP4 de las terminaciones sinápticas de corteza cerebral se deben al receptor de baja afinidad mGlu7. Esto mismo ha sido descrito en trabajos previos con sinaptosomas de corteza cerebral de rata (Millán y cols., 2002a, 2003; Ladera y cols., 2007). La expresión de los receptores mGlu del grupo III en las terminaciones de corteza cerebral de ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$  fue similar a la de los ratones control ( $\alpha_{1B}^{+/+}$ ). Así, el  $27,1 \pm 1,8\%$  de las partículas inmunorreactivas para sinaptofisina (7.611 de 78 campos analizados) también lo fueron para mGluR7a; mientras que apenas se detectó marcaje positivo para mGluR4a y mGluR8a ( $4,2 \pm 0,9\%$  y  $5,2 \pm 1,2\%$ , respectivamente, fig. IV. 11E-H). Por tanto, la falta de modulación de la liberación de glutamato observada en ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$  a pesar de la presencia de mGluR7 conduce a la conclusión de que, por algún motivo, este receptor no es capaz de inhibir la actividad de los canales de calcio de tipo P/Q.



**Figura IV. 11. La expresión de mGluR7 no se altera en botones sinápticos de ratones  $\alpha_{1B} -/-$ .**

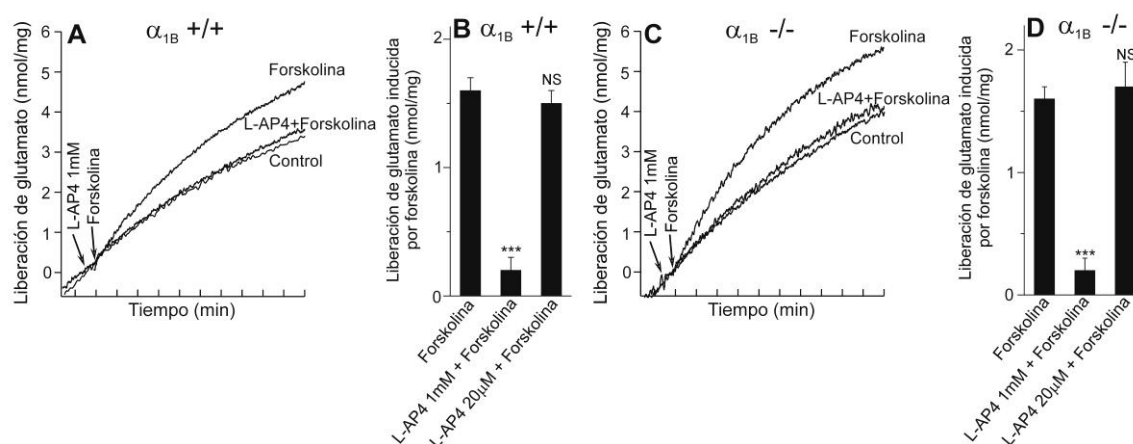
Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratones adultos se incubaron (2 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) a 37°C durante 1 hora; para después ser fijados sobre cubreobjetos previamente tratados con polilisina y teñidos con anticuerpos policlonales de cobaya contra mGluR4a (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), mGluR8a (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) o mGluR7a (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), y con el anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína vesicular sinaptofisina (1:100). La localización de los anticuerpos se visualizó con los fluorocromos Cy3 para sinaptofisina y Alexa 488 para mGluR4a, 8a y 7a en botones sinápticos tanto de ratones  $\alpha_{1B} +/+$  (A-C) como  $\alpha_{1B} -/-$  (E-G). Los cuadros insertados en la zona superior derecha muestran ampliada la región del campo señalada mediante flechas. Los histogramas muestran el contenido relativo (%) en receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III respecto de los botones sinápticos inmunopositivos para sinaptofisina. Para cada experimento se analizaron 78-81 campos obtenidos de 5-6 preparaciones de botones sinápticos. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores correspondientes en sinaptosomas de ratones  $\alpha_{1B} +/+$  mediante el test de la *t* de Student:  $^{NS}p > 0,05$ .

### 2.3. La pérdida del canal de calcio de tipo N no afecta a la inhibición de la adenilato ciclasa por mGluR7.

Tras confirmar la presencia del receptor mGlu7 en las terminaciones de corteza cerebral de ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$  decidimos estudiar si, a diferencia de la inhibición de los canales de calcio, el receptor conservaba el acoplamiento a otras vías de señalización. Los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III inhiben la adenilato ciclasa (Okamoto y cols., 1994; Conn y Pin, 1997; Millán y cols., 2002a) y esta disminución de los niveles de AMPc contrarresta el incremento de la liberación espontánea de glutamato provocado por la activación de la vía AMPc/PKA con forskolina (Weisskopf y cols., 1994; Herrero y Sánchez-Prieto, 1996). Por ello, determinamos la liberación de glutamato inducida por forskolina en presencia y ausencia del agonista L-AP4 en ratones  $\alpha_{1B}^{+/+}$  y en ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$ .

En los botones sinápticos de ratones control, forskolina incrementó la liberación espontánea de glutamato hasta  $1,6 \pm 0,1$  nanomoles ( $n=9$ ; fig. IV. 12A y B). Ésta liberación no fue modificada por la activación con L-AP4  $20 \mu\text{M}$  de los receptores metabotrópicos de glutamato de alta afinidad del grupo III ( $1,5 \pm 0,1$  nmol. de glutamato,  $n=5$ ,  $p>0,05$ ). Sin embargo, la liberación se redujo ampliamente tras la activación de los receptores mGlu7 con L-AP4  $1 \text{ mM}$  ( $0,2 \pm 0,1$  nmol. de glutamato,  $n=5$ ,  $p<0,001$ ; fig. IV. 12A y B).

De igual modo, en los ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$ , la liberación de glutamato inducida con forskolina ( $1,6 \pm 0,1$  nmol.;  $n=8$ ) no se redujo en presencia de L-AP4  $20 \mu\text{M}$  ( $1,7 \pm 0,2$  nmol.,  $n=5$ ,  $p>0,05$ ) pero sí lo hizo por la activación de mGluR7 con L-AP4  $1 \text{ mM}$  ( $0,2 \pm 0,1$  nmol.,  $n=8$ ,  $p<0,001$ , fig. IV. 12C y D). Por tanto, este resultado sugiere que, en los ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$ , a diferencia de lo que ocurre con la acción inhibitoria sobre los canales de calcio dependientes de voltaje, el receptor mGlu7 sí conserva su capacidad para acoplarse negativamente a la vía de la adenilato ciclasa y PKA.



**Figura IV. 12. El agonista L-AP4 reduce la liberación de glutamato inducida por forskolina en terminaciones sinápticas de corteza cerebral de ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$ .**

Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratones adultos se incubaron durante media hora, en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína). La liberación de glutamato se determinó en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  1,33mM en ratones  $\alpha_{1B}^{+/+}$  (A y B) y  $\alpha_{1B}^{-/-}$  (C y D) y en ambos casos en ausencia (control) y en presencia de forskolina 100  $\mu$ M. En los experimentos con forskolina, también se determinó la liberación de glutamato tras añadir L-AP4 20  $\mu$ M o L-AP4 1mM 30 segundos antes de forskolina. En los paneles A y C sólo se muestran los experimentos con L-AP4 1mM. Los histogramas (By D) representan la liberación acumulada tras 10 min con las condiciones indicadas. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 5-9 experimentos realizados en 5-9 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores en ausencia de L-AP4 mediante el test de la *t* de Student: NS  $p > 0,05$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 2.4. En los botones sinápticos de corteza cerebral, la oclusión de las respuestas de los receptores mGlu7, GABA<sub>B</sub> y adenosina A<sub>1</sub> se limita a la liberación de glutamato mediada por canales de calcio de tipo N.

Ya ha sido descrito que, aparte de mGluR7, otros receptores acoplados a proteínas G como los receptores de adenosina A<sub>1</sub> y de GABA<sub>B</sub> también inhiben la transmisión sináptica (Wu y Saggau, 1994, 1995b). En los sinaptosomas de corteza cerebral, la activación de los receptores A<sub>1</sub>, con el agonista CHA, y de los receptores GABA<sub>B</sub>, con el agonista baclofén, redujo la liberación de glutamato en los ratones control ( $\alpha_{1B}^{+/+}$ ) ( $38,3 \pm 0,6\%$ ,  $n=3$ , y  $22,9 \pm 0,9\%$ ,  $n=3$ , fig. IV. 13A), respectivamente. Si los receptores mGlu7, GABA<sub>B</sub> y adenosina A<sub>1</sub> estuvieran expresados en diferentes terminaciones nerviosas, la respuesta inhibitoria esperada tras una activación simultánea de los mismos, sería la suma aritmética de las respuestas inhibitorias individuales. Sin embargo, la coadición de los tres agonistas redujo la liberación en sólo un  $47,7 \pm 5,9\%$  (fig. IV. 13A, barra continua), magnitud significativamente menor

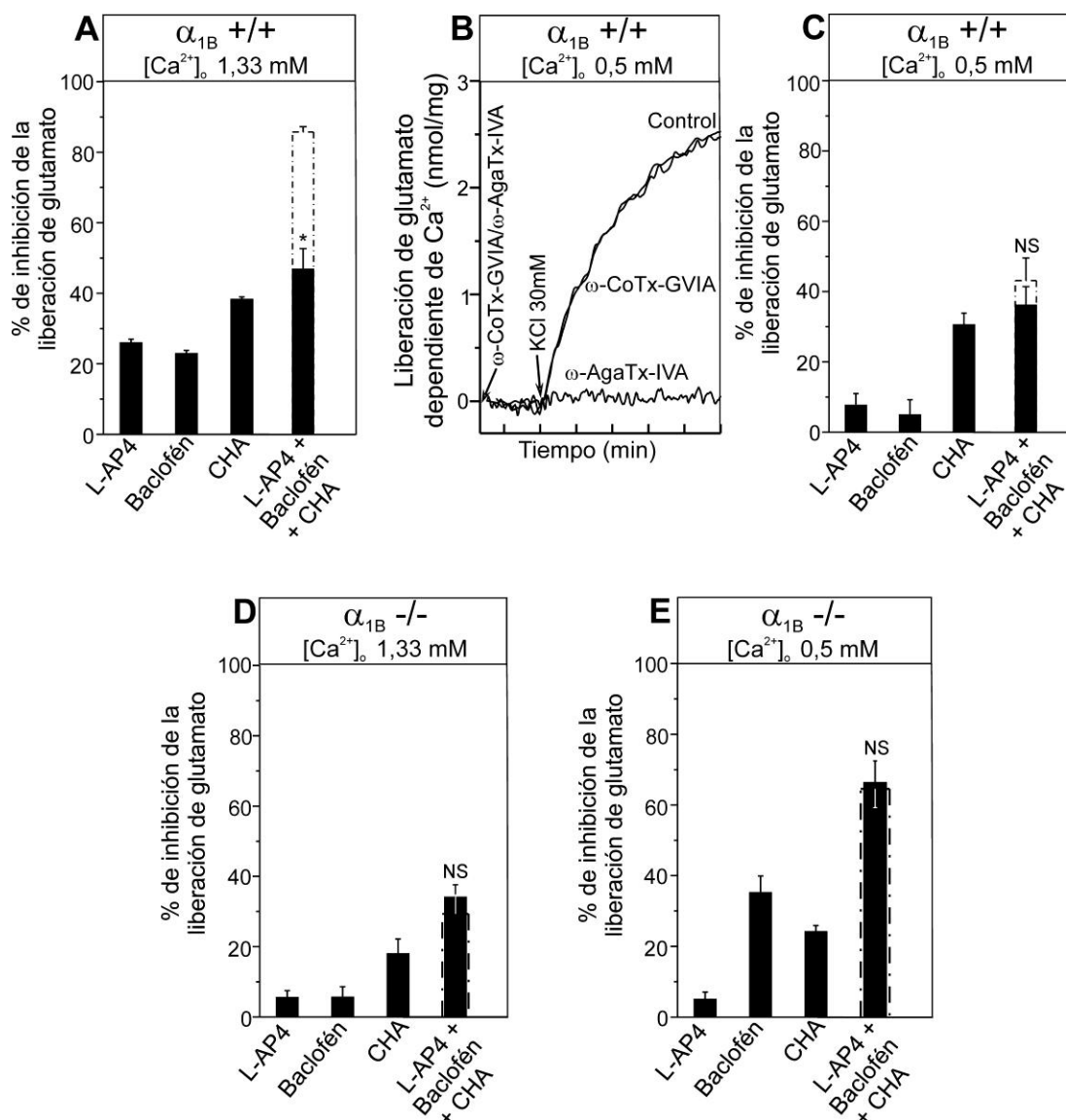
( $p < 0,05$ ) que la respuesta inhibitoria resultante de la suma aritmética de las respuestas individuales de los tres receptores ( $87,3 \pm 1,5\%$ ,  $n=3$ , fig. IV. 13A, barra discontinua). Esta oclusión de las respuestas sugiere que estos tres receptores se coexpresan en una misma población de terminaciones sinápticas. Dado que las respuestas a mGluR7 sólo tienen lugar en terminaciones sinápticas que contienen canales de calcio de tipo N, parece lógico pensar que la oclusión debe restringirse a esos botones sinápticos y que, por tanto, la supresión del componente de liberación asociado a canales N debe eliminar esta oclusión de las respuestas.

Como ya se ha explicado con anterioridad, los canales de calcio de tipo N son menos eficientes en su acoplamiento a la liberación de glutamato que los canales P/Q (Wu y cols., 1999; Millán y cols., 2003; González-Inchauspe y cols., 2007); por lo que una manera de eliminar la contribución de los canales N a la liberación es disminuyendo la concentración extracelular de calcio ( $[Ca^{2+}]_{ext}$ ) (Millán y cols., 2003). A la  $[Ca^{2+}]_{ext}$  de 0,5 mM,  $\omega$ -conotoxina-GVIA no redujo la liberación de glutamato ( $-2,4 \pm 1,0\%$ ,  $n=4$ ,  $p > 0,05$ ). Además, la liberación fue suprimida en su totalidad por  $\omega$ -agatoxina-IVA ( $101,6 \pm 1,5\%$ ,  $n=4$ , fig. IV. 13B), lo que indica que, en estas condiciones, la liberación de glutamato es controlada exclusivamente por canales de calcio de tipo P/Q. La reducción de la  $[Ca^{2+}]_{ext}$  disminuyó la respuesta inhibitoria a CHA ( $30,6 \pm 3,3\%$ ,  $n=5$ ) y suprimió casi en su totalidad las respuestas inducidas por baclofén y L-AP4 ( $4,8 \pm 4,3\%$ ,  $n=4$ , y  $7,7 \pm 3,3\%$ ,  $n=3$ , fig. IV. 13C). Hecho éste que sugiere una restricción de la oclusión de las respuestas inhibitorias de los tres receptores a terminaciones sinápticas con canales N. Además, en las condiciones mencionadas de calcio extracelular reducido, la activación simultánea de los tres receptores redujo la liberación de glutamato en un  $36,2 \pm 5,3\%$  ( $n=6$ ; fig. IV. 13 C, barra continua), una magnitud similar ( $p > 0,05$ ) a la calculada en el supuesto de que los tres receptores se situaran en botones sinápticos distintos y que su respuesta inhibitoria fuera el resultado de la suma aritmética de las respuestas individuales ( $43,2 \pm 6,4\%$ ; fig. IV. 13C, barra discontinua). Por tanto, la pérdida de oclusión de las respuestas inhibitorias cuando la liberación está controlada exclusivamente por canales de tipo P/Q supone una robusta evidencia de que los tres receptores sólo se coexpresan en las terminaciones sinápticas con canales de calcio de tipo N y no en las terminaciones que contienen canales P/Q.

Además de la reducción de la concentración de calcio extracelular, como método alternativo para eliminar la contribución de los canales N a la liberación de glutamato se prepararon sinaptosomas de ratones que carecen de la subunidad  $\alpha_{1B}$  del canal de calcio de tipo N. En las terminaciones sinápticas

de corteza cerebral de estos ratones, se determinaron las respuestas inhibitoras inducidas por CHA ( $18,0 \pm 4,2\%$ ,  $n=6$ ), L-AP4 ( $5,6 \pm 1,9\%$ ,  $n=7$ ) y baclofén ( $5,7 \pm 2,9\%$ ,  $n=5$ , fig. IV. 13D). La inhibición de la liberación tras la activación simultánea de los tres receptores metabotrópicos ( $34,0 \pm 3,6\%$ ,  $n=5$ ) fue de magnitud similar ( $p>0,05$ ) a la suma aritmética de las respuestas inhibitoras individuales ( $29,3 \pm 5,4\%$ , fig. IV. 13D). Dado el mejor acoplamiento de los canales de calcio de tipo P/Q a la liberación de glutamato, es posible que parte de las respuestas inhibitoras estén enmascaradas. De manera que, aunque reducida, la entrada de calcio sea suficiente para mantener la exocitosis. Por ello, pensamos que la reducción de la concentración extracelular de calcio debería hacer más patentes los efectos inhibidores de los receptores sobre la liberación de glutamato. De este modo, mientras que las modulaciones por CHA ( $24,2 \pm 1,7\%$ ,  $n=3$ ) y L-AP4 ( $5,1 \pm 2,0\%$ ,  $n=3$ ) no se incrementaron ( $p>0,05$ ) al reducir la concentración de calcio extracelular a  $0,5\text{mM}$ , la inhibición de la liberación de glutamato por baclofén sí se hizo patente ( $35,3 \pm 4,6\%$ ,  $n=4$ ,  $p<0,001$ ; fig. IV. 13E), lo que contrasta con la ausencia de modulación por este agonista en condiciones de alta concentración de calcio extracelular. Esta ganancia de función mediada por receptores GABA<sub>B</sub> podría reflejar un cambio adaptativo ante la pérdida de función de los receptores mGlu7 en los ratones que han perdido el canal de calcio de tipo N. No obstante, a pesar del incremento de la inhibición por baclofén, la magnitud de la liberación tras la coactivación de los tres receptores ( $66,5 \pm 6,0$ ,  $n=4$ ; fig IV. 13 E, barra continua) fue similar ( $p>0,05$ ) a la suma de las inhibiciones individuales ( $64,6 \pm 5,3$ ; fig. IV. 13E, barra discontinua). Por tanto, en los ratones que carecen de canales N, los receptores GABA<sub>B</sub> y adenosina A<sub>1</sub> se expresan en poblaciones de terminaciones sinápticas distintas, de lo que se infiere que la presencia de receptores mGluR7 funcionales parece que es un requerimiento necesario para que tenga lugar la coexpresión de los tres receptores metabotrópicos.





**Figura IV. 13.** En los terminales de corteza cerebral, la oclusión de las respuestas de los receptores mGlu7, GABA<sub>B</sub> y adenosina A<sub>1</sub> se limita a la liberación mediada por canales de Ca<sup>2+</sup> de tipo N.

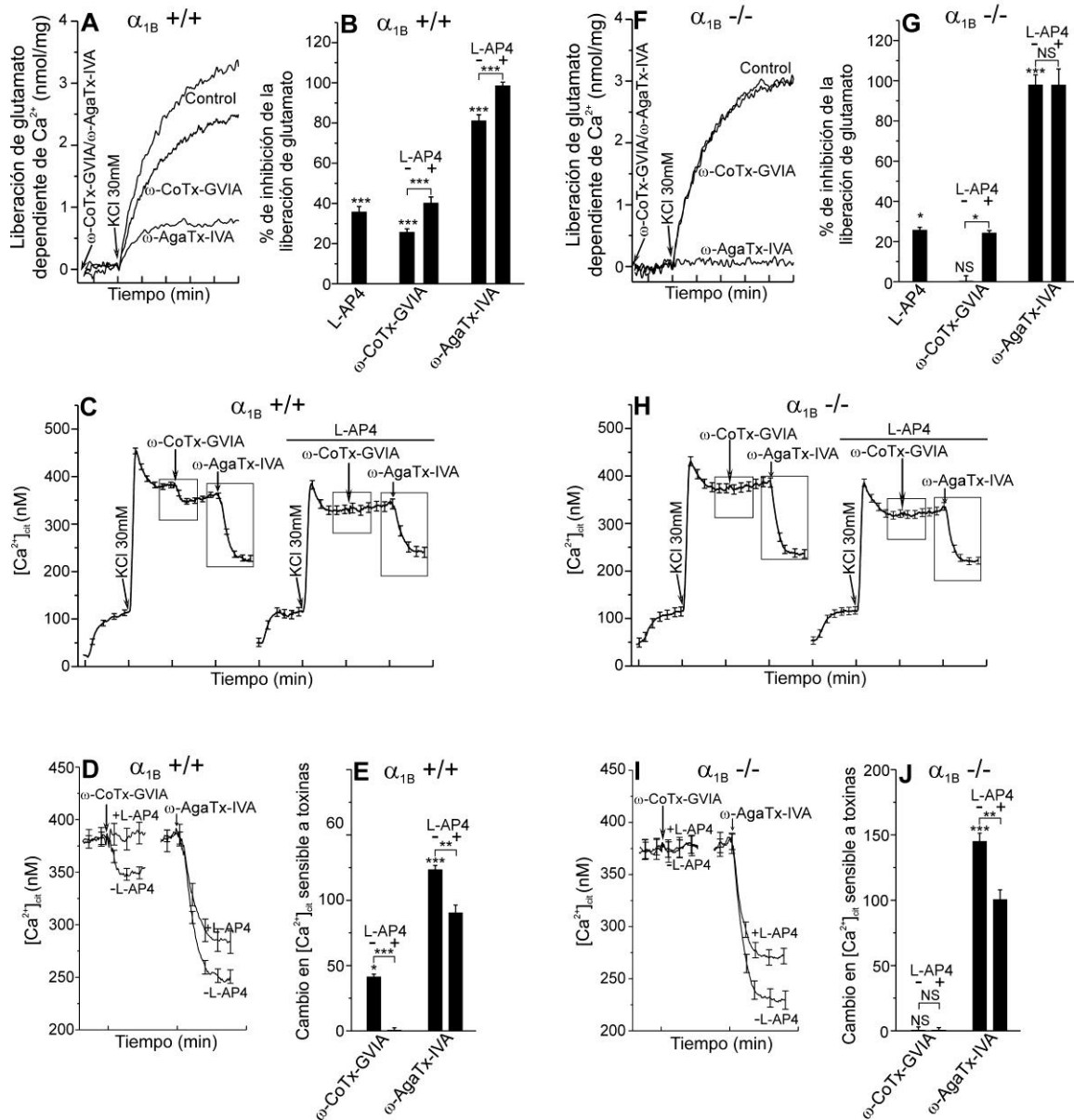
Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratones adultos se incubaron durante media hora en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína). (A, C, D y E), % de inhibición de la liberación de glutamato dependiente de Ca<sup>2+</sup> inducida por KCl 30 mM, en presencia de los agonistas L-AP4 (1mM), baclofén (20μM) y CHA (1μM) añadidos simultáneamente o por separado 30 segundos antes de la despolarización en sinaptosomas de ratones  $\alpha_{1B} +/+$  (A y C) y  $\alpha_{1B} -/-$  (D y E) y en presencia de  $[Ca^{2+}]_{ext}$  1,33mM (A y D) o  $[Ca^{2+}]_{ext}$  0,5mM (C y E). Las columnas de trazo continuo muestran los resultados experimentales mientras que las de trazo discontinuo representan la inhibición teórica resultante de la suma de las inhibiciones observadas para cada agonista añadido por separado. B, Liberación de glutamato dependiente de calcio inducida por KCl 30 mM en terminales sinápticos de ratones  $\alpha_{1B} +/+$  en un medio con una  $[Ca^{2+}]_{ext}$  de 0,5 mM, tanto en presencia como en ausencia (control) de las toxinas de canales de Ca<sup>2+</sup>  $\omega$ -CoTx-GVIA (2μM) y  $\omega$ -AgaTx-IVA (200nM) añadidas 100 segundos antes de despolarizar. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de n=3-7 experimentos realizados en 3-7 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores teóricos para una inhibición aditiva mediante el test de la *t* de Student: NS  $p > 0,05$  y \* $p < 0,05$ .

## 2.5. Los receptores mGlu7 modulan la liberación de glutamato y la entrada de calcio asociadas tanto a canales de calcio de tipo N como de tipo P/Q en terminaciones sinápticas de hipocampo de ratón.

Una posible explicación del hecho de que la oclusión de las respuestas de los tres receptores quede restringida al componente de la liberación de glutamato controlado por canales de calcio de tipo N podría ser la mayor susceptibilidad de estos canales de calcio a la modulación por proteínas G (Zhang y cols., 1996; Currie y Fox, 1997; González-Inchauspe y cols., 2007). Para abordar esta posibilidad se usaron botones sinápticos de hipocampo donde, como antes hemos puesto de manifiesto, los receptores mGlu7 modulan la liberación de glutamato asociada tanto a canales de calcio de tipo N como de tipo P/Q. En terminaciones sinápticas de hipocampo de ratones control ( $\alpha_{1B} +/+$ ),  $\omega$ -conotoxina-GVIA y  $\omega$ -agatoxina-IVA redujeron la liberación de glutamato un  $25,6 \pm 1,8\%$  ( $n=8$ ,  $p<0,001$ ) y un  $81,8 \pm 3,0\%$  ( $n=7$ ,  $p<0,001$ ), respectivamente (Fig. IV. 14A y B). Además, la inhibición de la liberación por L-AP4 ( $35,7 \pm 2,8\%$ ;  $n=9$ ;  $p<0,001$ ) fue ocluida en parte tanto por  $\omega$ -conotoxina-GVIA ( $14,6 \pm 3,3\%$ ;  $n=8$ ,  $p<0,001$ ) como por  $\omega$ -agatoxina-IVA ( $18,2 \pm 3,7\%$ ;  $n=6$ ;  $p<0,001$ ; fig. IV. 14A y B). De acuerdo con estos resultados, los experimentos de medida de calcio intrasinaptosomal revelaron que mGluR7 reduce la entrada de calcio mediada tanto por canales de tipo N como de tipo P/Q. De este modo, el incremento en la concentración citosólica de calcio ( $[Ca^{2+}]_{cit}$ ) inducido por KCl 30 mM fue reducido tanto por  $\omega$ -conotoxina-GVIA ( $41,3 \pm 2,1$  nM;  $n=4$ ;  $p<0,05$ ) como por  $\omega$ -agatoxina-IVA ( $123,4 \pm 3,2$  nM;  $n=4$ ;  $p<0,001$ ; fig. IV. 14C, D y E). Además, L-AP4 suprimió la respuesta a  $\omega$ -conotoxina-GVIA ( $-0,1 \pm 1,8$  nM;  $n=5$ ;  $p<0,001$ ) y atenuó la respuesta a  $\omega$ -agatoxina-IVA ( $90,3 \pm 6,0$  nM;  $n=7$ ;  $p<0,01$ ; fig. IV. 14C, D y E). Por tanto, en los botones sinápticos de hipocampo de ratones  $\alpha_{1B} +/+$ , mGluR7 modula la entrada calcio controlada tanto por canales de calcio de tipo N como de tipo P/Q.

En las terminaciones sinápticas de hipocampo de ratones  $\alpha_{1B} -/-$  la liberación de glutamato recae exclusivamente sobre canales de calcio de tipo P/Q ( $97,9 \pm 5\%$ ,  $n=5$ ,  $p<0,001$ ), esta liberación resultó inhibida significativamente por L-AP4 ( $25,7 \pm 1,4\%$ ;  $n=5$ ,  $p<0,05$ ; fig. IV. 12F y G). De acuerdo con esto, el incremento en la concentración citosólica de calcio inducido por KCl no se redujo en presencia de  $\omega$ -conotoxina-GVIA ( $-1,1 \pm 2,3$  nM,  $n=5$ ,  $p>0,05$ ) siendo, en cambio, fuertemente inhibido por  $\omega$ -agatoxina-IVA ( $145,0 \pm 6,3$  nM;  $n=5$ ;  $p<0,001$ ). Esta inhibición resultó en parte ocluida por L-AP4 ( $100,5 \pm 7,4$  nM;  $n=4$ ;  $p<0,01$ ; fig. IV. 14H, I y J). Por tanto, los receptores mGlu7

reducen la entrada de calcio controlada por canales de calcio de tipo P/Q en los botones de hipocampo de ratones que carecen del canal de calcio de tipo N.

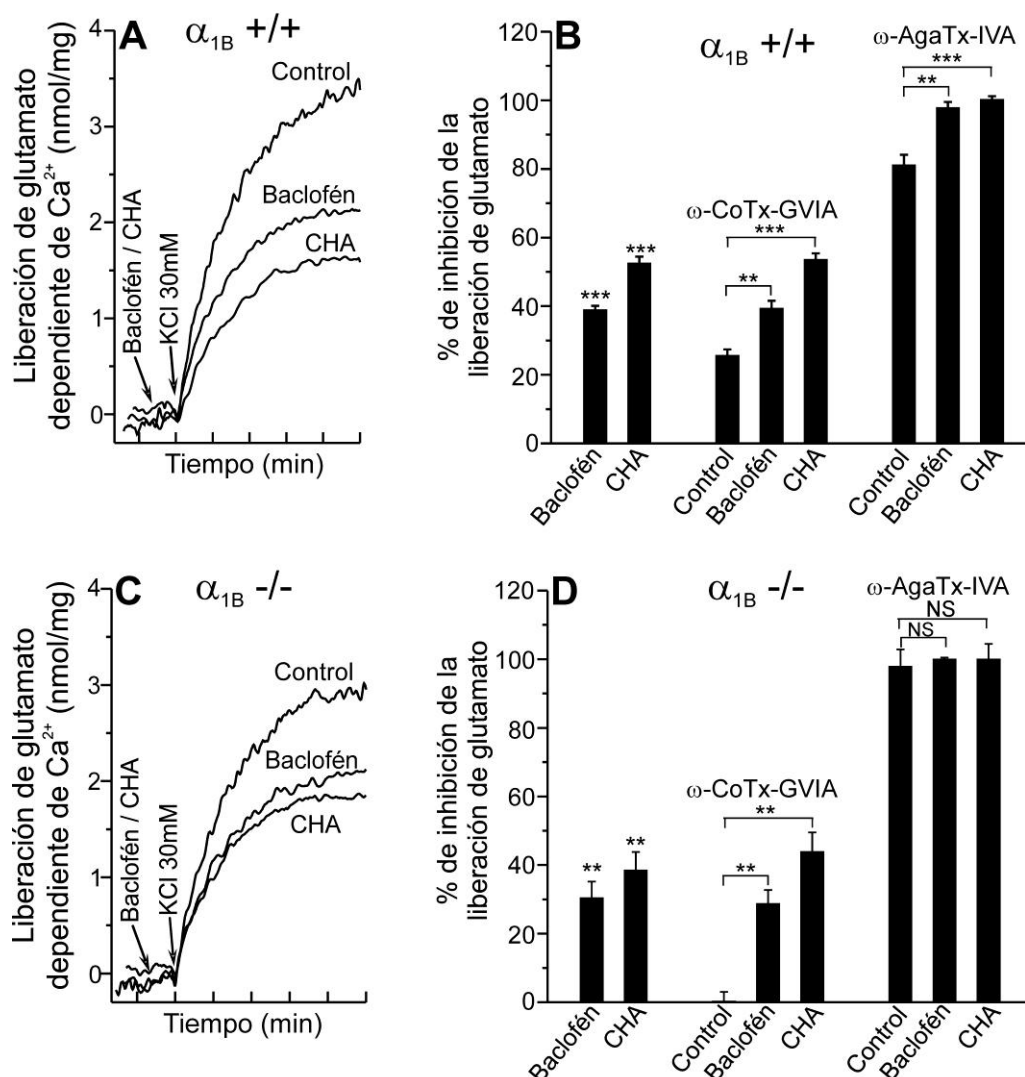


**Figura IV. 14. mGluR7 inhibe la liberación de glutamato y la entrada de  $Ca^{2+}$  controladas tanto por canales de tipo N como P/Q en botones sinápticos de hipocampo**

Los sinaptosomas de hipocampo de ratones adultos se incubaron media hora en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína). La liberación de glutamato inducida con KCl 30 mM en presencia de  $[Ca^{2+}]_{\text{ext}}$  1,33mM se determinó en terminales de ratones  $\alpha_{1B}^{+/+}$  (A y B) y  $\alpha_{1B}^{-/-}$  (F y G), en presencia y ausencia (control) de L-AP4, y en presencia y ausencia de las toxinas añadidas antes de la despolarización a los tiempos indicados:  $\omega$ -CoTx-GVIA (2 $\mu$ M, 100 s.);  $\omega$ -AgaTx-IVA (200nM, 100 s.) y L-AP4 (1mM, 30 s.). (B y G) Liberación acumulada tras 5 min. de despolarización bajo las condiciones mencionadas. El incremento en la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  libre ( $[Ca^{2+}]_{\text{cit}}$ ) inducido con KCl 30 mM en presencia de  $[Ca^{2+}]_{\text{ext}}$  1,33mM se determinó en sinaptosomas de ratones  $\alpha_{1B}^{+/+}$  (C y E) y  $\alpha_{1B}^{-/-}$  (H y J). Las toxinas  $\omega$ -CoTx-GVIA (2 $\mu$ M) y  $\omega$ -AgaTx-IVA (200nM) se añadieron, respectivamente, 1 min. y 2 min. tras la despolarización. L-AP4 1mM se añadió 40 s. antes de la despolarización. (D e I) detalle de las respuestas a  $\omega$ -CoTx-GVIA y  $\omega$ -AgaTx-IVA recuadradas en C y H. (E y J) Magnitud de la entrada de  $Ca^{2+}$  sensible a las toxinas en ausencia y en presencia de L-AP4. Los resultados representan la media  $\pm$  error típico de 7-9 experimentos realizados en 7-9 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores control (ya sea en ausencia de toxinas o en ausencia de L-AP4) mediante el test de la *t* de Student: NS  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 2.6. La oclusión de las respuestas de los receptores mGlu7, GABA<sub>B</sub> y adenosina A<sub>1</sub> también afecta a la liberación de glutamato mediada por canales de calcio de tipo P/Q en botones sinápticos de hipocampo.

Además de los receptores mGlu7, se ha descrito que los receptores adenosina A<sub>1</sub> y GABA<sub>B</sub> también modulan la transmisión sináptica en el hipocampo (Wu y Saggau, 1994, 1995b). En consecuencia, nos preguntamos si estos últimos también modulan la liberación controlada por canales de calcio de tipo P/Q en las terminaciones nerviosas hipocámpales de ratones control ( $\alpha_{1B} +/+$ ). Así, observamos que las respuesta inhibitoras de baclofén ( $38,9 \pm 1,2\%$ ;  $n=4$ ;  $p<0,001$ ) y de CHA ( $52,5 \pm 1,9\%$ ;  $n=4$ ;  $p<0,001$ ) fueron parcialmente ocluidas tras el bloqueo tanto de los canales de calcio de tipo N ( $13,8 \pm 2,2\%$ ;  $n=3$ ;  $p<0,01$  y  $28,0 \pm 2,5\%$ ;  $n=4$ ;  $p<0,001$ ; respectivamente) como de los canales de calcio de tipo P/Q ( $16,7 \pm 3,4\%$ ;  $n=4$ ;  $p<0,01$  y  $23,1 \pm 3,2\%$ ;  $n=3$ ;  $p<0,001$ ; respectivamente) (fig. IV. 15A y B). Podemos concluir, por tanto, que los receptores GABA<sub>B</sub> y adenosina A<sub>1</sub> modulan tanto la liberación de glutamato acoplada a canales de calcio de tipo N como P/Q en los ratones control ( $\alpha_{1B} +/+$ ). En los ratones que han perdido el canal de calcio de tipo N ( $\alpha_{1B} -/-$ ) y, por tanto, también la liberación asociada al mismo; permanecieron las respuestas inhibitoras de baclofén ( $30,4 \pm 4,8\%$ ;  $n=3$ ;  $p<0,01$ ) y CHA ( $38,5 \pm 5,2\%$ ;  $n=6$ ;  $p<0,01$ ). Además, como cabía esperar, dichas respuestas inhibitoras fueron insensibles al bloqueo de los canales N con  $\omega$ -conotoxina-GVIA ( $28,7 \pm 4,0\%$ ;  $n=3$ ;  $p<0,01$  y  $43,9 \pm 5,6\%$ ;  $n=5$ ;  $p<0,01$ ; para baclofén y CHA, respectivamente; fig. IV 13C y D) resultando, por el contrario, ocluidas en su totalidad con el bloqueante de los canales P/Q,  $\omega$ -agatoxina-IVA ( $2,2 \pm 2,1\%$ ;  $n=3$ ;  $p>0,05$  y  $2,1 \pm 6,7\%$ ;  $n=3$ ;  $p>0,05$ ; fig. IV 15C y D). Por tanto, en los ratones  $\alpha_{1B} -/-$  los receptores GABA<sub>B</sub> y adenosina A<sub>1</sub> mantienen su modulación sobre la liberación de glutamato asociada al canal de calcio de tipo P/Q.



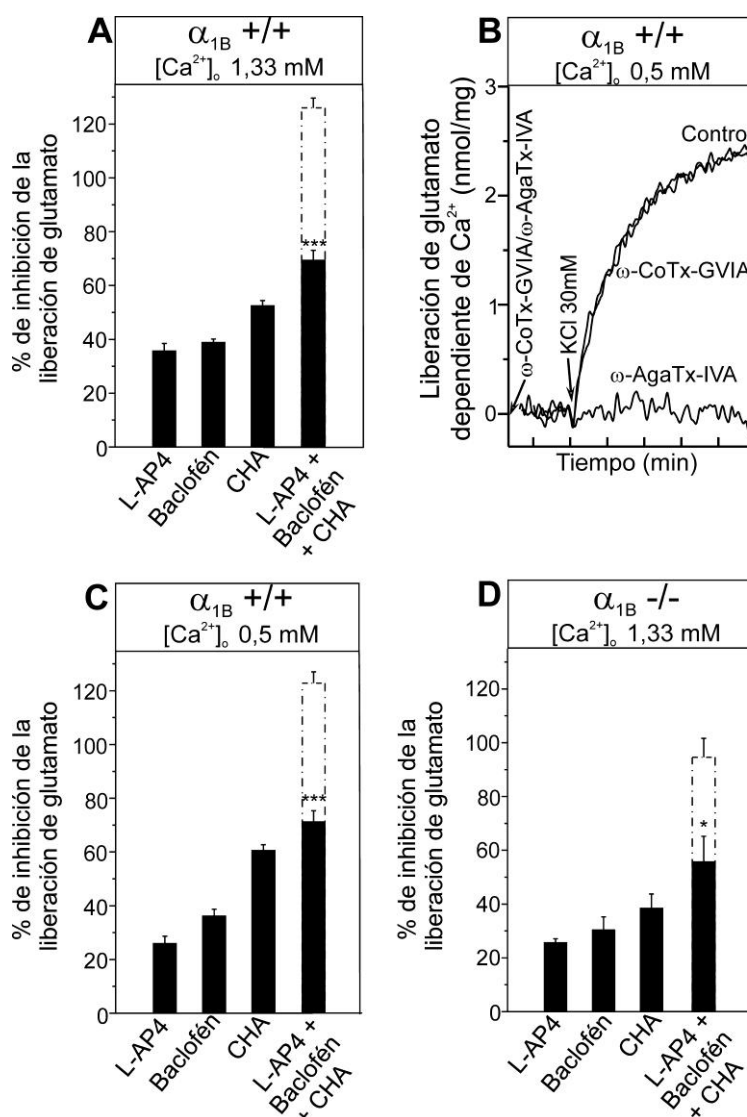
**Figura IV. 15. Los receptores GABA<sub>B</sub> y adenosina A<sub>1</sub> inhiben la liberación de glutamato mediada tanto por canales de Ca<sup>2+</sup> de tipo N como de tipo P/Q en los botones sinápticos de hipocampo.**

Los sinaptosomas de hipocampo de ratones adultos durante media hora en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína). La liberación de glutamato dependiente de calcio inducida por KCl 30mM en presencia de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ext</sub> 1,33mM fue determinada tanto en terminales sinápticos de ratones  $\alpha_{1B}^{+/+}$  (A y B) como  $\alpha_{1B}^{-/-}$  (C y D) en presencia y en ausencia (control) de bloqueantes de canales de Ca<sup>2+</sup>, además de en presencia y en ausencia de baclofén y CHA añadidos previamente a la despolarización a los tiempos indicados a continuación:  $\omega$ -CoTx-GVIA (2  $\mu$ M, 100 s.);  $\omega$ -AgaTx-IVA (200nM, 100 s.); baclofén (20  $\mu$ M, 30 s.) y CHA (1  $\mu$ M, 30 s.). Los histogramas B y D muestran la liberación acumulada tras 5 minutos de despolarización con las condiciones mencionadas. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3-6 experimentos realizados en 3-6 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores control (ya sea en ausencia de agonistas o en ausencia de toxinas) mediante el test de la *t* de Student: NS  $p > 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

A continuación, pasamos a analizar si el fenómeno de convergencia de respuestas inhibitorias de los receptores de GABA<sub>B</sub>, adenosina A<sub>1</sub> y mGlu7 que observamos en la corteza cerebral también tiene lugar en las terminaciones nerviosas hipocámpales. La activación simultánea de los tres receptores tuvo como resultado una inhibición de la liberación de glutamato ( $70,1 \pm 3,7\%$ ;  $n=9$ ) de magnitud significativamente menor ( $p<0,001$ ) que la inhibición teórica esperada por activación independiente de los receptores ( $129,2 \pm 3,6\%$ ; fig. IV. 16A). Dado que, en los botones sinápticos de hipocampo, las respuestas inhibitorias de los tres receptores dependen de la actividad tanto de los canales de calcio de tipo N como de tipo P/Q, realizamos experimentos de liberación de glutamato en presencia de una concentración de calcio extracelular ( $[Ca^{2+}]_{ext}$ ) de 0,5mM para suprimir la contribución de los canales de calcio de tipo N a la liberación (Millán y cols., 2003) y así poder determinar si el fenómeno de la oclusión de las respuestas inhibitorias afecta también a la liberación asociada a canales de calcio de tipo P/Q. En efecto, a la  $[Ca^{2+}]_{ext}$  de 0,5 mM, la liberación de glutamato fue suprimida en su totalidad por  $\omega$ -agatoxina-IVA ( $102,1 \pm 7,5\%$ ;  $n=4$ ;  $p<0,001$ ) resultando, en cambio, insensible al bloqueo de los canales N ( $-3,0 \pm 1,1\%$ ;  $n=3$ ;  $p>0,05$ ; fig. IV. 16B). En estas condiciones, L-AP4, baclofén y CHA inhibieron la liberación de glutamato en un  $26,0 \pm 2,7\%$  ( $n=3$ ),  $36,2 \pm 2,5\%$  ( $n=4$ ) y  $60,5 \pm 2,2\%$  ( $n=4$ ), respectivamente (fig. IV. 16C). Cabe resaltar el hecho de que la magnitud de la respuesta inhibitoria por coactivación de los tres receptores ( $71,2 \pm 4,1\%$ ;  $n=4$ ) fue significativamente menor ( $p<0,001$ ) que la esperada por la simple adición de las respuestas de cada una de forma independiente ( $122,7 \pm 4,2\%$ ;  $n=4$ ; fig. IV. 16C). Por tanto, esta fuerte oclusión de las respuestas puso de manifiesto que estos receptores coexisten, al menos en una subpoblación de botones sinápticos hipocámpales que contienen canales de calcio de tipo P/Q.

Para confirmar el hecho de que la actividad de los receptores de mGlu7, GABA<sub>B</sub> y adenosina A<sub>1</sub> converge en sitios de liberación controlados por canales de calcio de tipo P/Q realizamos ensayos de liberación de glutamato en ratones con ausencia del canal de calcio de tipo N ( $\alpha_{1B}^{-/-}$ ), donde la liberación de glutamato está controlada exclusivamente por canales de calcio de tipo P/Q. Así, en los botones sinápticos de hipocampo de estos ratones, tanto L-AP4 como baclofén y CHA inhibieron la liberación de glutamato en un  $25,7 \pm 1,4\%$  ( $n=5$ );  $30,4 \pm 4,8\%$  ( $n=3$ ) y  $38,5 \pm 5,3\%$  ( $n=6$ ), respectivamente (fig. IV. 16D). De nuevo, la magnitud de la inhibición tras la activación simultánea de los tres receptores ( $55,7 \pm 9,5\%$ ;  $n=3$ ) fue significativamente menor ( $p<0,05$ ) que la esperada para una activación independiente de los mismos ( $94,2 \pm 7,0\%$ ; fig. IV. 16D). Por

tanto, queda demostrada la coexistencia de los tres receptores en terminaciones nerviosas de hipocampo con canales de calcio de tipo P/Q.



**Figura IV. 16.** La oclusión de las respuestas de los receptores mGlu7, GABA<sub>B</sub> y adenosina A<sub>1</sub> también afecta a la liberación mediada por canales de calcio de tipo P/Q en terminaciones sinápticas de hipocampo.

Los sinaptosomas de hipocampo de ratones adultos se incubaron durante media hora en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína). (A, C, y D), inhibición (%) de la liberación de glutamato dependiente de  $Ca^{2+}$  inducida por KCl 30 mM, en presencia de los agonistas L-AP4 (1mM), baclofén (20 $\mu$ M) y CHA (1 $\mu$ M) añadidos simultáneamente o por separado 30 segundos antes de la despolarización en terminales de ratones  $\alpha_{1B} +/+$  (A y C) o  $\alpha_{1B} -/-$  (D) y en presencia de  $Ca^{2+}$  1,33mM (A y D) o  $Ca^{2+}$  0,5mM (C). Las columnas de trazo continuo muestran los resultados experimentales mientras que las de trazo discontinuo representan la inhibición teórica resultante de la suma de las inhibiciones observadas para cada agonista añadido por separado. B, Liberación de glutamato dependiente de calcio inducida por KCl 30 mM en terminales sinápticos de ratones  $\alpha_{1B} +/+$  en un medio con  $Ca^{2+}$  0,5 mM tanto en presencia como en ausencia (control) de las toxinas de canales de  $Ca^{2+}$   $\omega$ -CoTx-GVIA (2 $\mu$ M) y  $\omega$ -AgaTx-IVA (200nM) añadidas 100 segundos antes de despolarizar. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de n=3-7 experimentos realizados en 3-7 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores teóricos para una inhibición aditiva mediante el test de la *t* de Student: <sup>NS</sup>p>0,05 y \*p<0,05.



### 3. Propiedades diferenciales de los botones sinápticos que expresan canales de calcio de tipo N ó canales de tipo P/Q.

La exocitosis de los neurotransmisores, incluido el glutamato, se inicia con la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje de los tipos N, P/Q y R (Westenbroeck y cols., 1992; 1995 y 1998). Como ya se ha mencionado con anterioridad, en muchas sinapsis, durante el desarrollo hay una disminución de la liberación controlada por canales de tipo N en favor de la liberación acoplada a canales de tipo P/Q. Además, se observa la sustitución de la acción cooperativa de diversos tipos canales de calcio débilmente acoplados a la exocitosis (N, P/Q y R) por el control casi exclusivo por canales de calcio de tipo P/Q, eficientemente acoplados a la liberación de glutamato (Fedchyshyn y Wang, 2005). No obstante, en las terminaciones sinápticas de corteza cerebral, los canales de tipo N aún controlan una parte importante de la liberación de glutamato en animales adultos (Vázquez y Sánchez-Prieto, 1997; Iwasaki y cols., 2000; Millán y cols., 2002a, 2003). Por otro lado, los experimentos de imagen de calcio de botones sinápticos individuales han puesto de manifiesto la segregación entre canales de calcio de tipo N y P/Q en distintas subpoblaciones de botones sinápticos (Millán y cols., 2003). Por tanto, la existencia de botones sinápticos con distinto tipo de canales de calcio suscita interés acerca de la posible existencia de propiedades diferenciales.

En el apartado 2 de *Resultados* se han analizado algunas diferencias en la dotación de receptores presinápticos de las terminaciones que contienen canales de tipo N o P/Q, poniendo de manifiesto que la coexistencia de los receptores de adenosina A<sub>1</sub>, GABA<sub>B</sub> y mGlu7 sólo tiene lugar en botones sinápticos que presentan canales de calcio de tipo N. Hecho éste que podría estar de acuerdo con la mayor susceptibilidad a la modulación por proteínas G que se ha observado para este tipo de canales (Zhang y cols., 1996).

Por otro lado, parece que ambos tipos de canales de calcio difieren en su grado de acoplamiento a la exocitosis, siendo éste mayor para los canales de tipo P/Q tanto en los botones sinápticos de la corteza cerebral (Millán y Sánchez-Prieto, 2002) como en los de hipocampo (fig. IV.2, apartado 2).

Por tanto, con el objetivo de explorar las diferentes propiedades de la liberación de glutamato de las terminaciones sinápticas con canales N y en terminaciones sinápticas con canales P/Q, hemos aislado cada uno de los dos componentes de liberación tanto farmacológicamente, mediante el uso de bloqueantes específicos de estos dos tipos de canales, como mediante el uso de ratones carentes de la subunidad principal del canal de calcio de tipo N (ratones

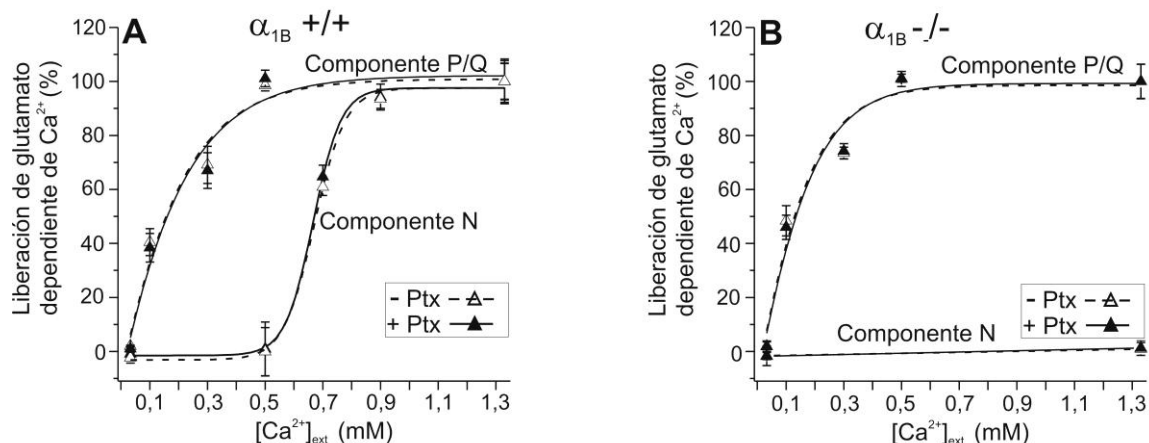
$\alpha_{1B}^{-/-}$ , Ino y cols., 2001), en los que toda la liberación de glutamato pasa a estar controlada exclusivamente por canales de tipo P/Q.

### 3.1. Los canales de calcio de tipo N están peor acoplados a la exocitosis de glutamato que los canales de tipo P/Q.

Para analizar las posibles diferencias entre las propiedades del acoplamiento a la exocitosis de los botones sinápticos que contienen canales de tipo N o de tipo P/Q, determinamos la liberación de glutamato inducida con KCl 30 mM en presencia de concentraciones crecientes de calcio extracelular así como de las toxinas bloqueantes de los canales de calcio de tipo N,  $\omega$ -conotoxina-GVIA, y de tipo P/Q,  $\omega$ -agatoxina-IVA.

En los botones sinápticos de los ratones control ( $\alpha_{1B}^{+/+}$ ), la liberación de glutamato inducida con KCl en presencia de una concentración de calcio extracelular ( $[Ca^{2+}]_{ext}$ ) de 1,33 mM alcanzó  $4,2 \pm 0,3$  nmol. ( $n=5$ ) y la contribución de los dos tipos de canales a la misma fue de  $1,56 \pm 0,2$  nmol. de glutamato en el caso de los canales de tipo N y de  $3,05 \pm 0,2$  nmol. en el caso de los de tipo P/Q. A medida que la concentración de  $[Ca^{2+}]_{ext}$  disminuyó, lo hizo también la contribución de los canales de calcio de tipo N, de manera que a una  $[Ca^{2+}]_{ext}$  de 0,5 mM no se detectó liberación mediada por estos canales ( $0,04 \pm 0,1$  nmol de glutamato,  $n=5$ ,  $p<0,01$  comparada con la liberación a  $[Ca^{2+}]_{ext}$  de 1,33 mM). Por el contrario, esta misma caída en la  $[Ca^{2+}]_{ext}$  no afectó a la liberación de glutamato acoplada a los canales de calcio de tipo P/Q, que se mantuvo en  $2,93 \pm 0,2$  nmol ( $n=5$ ,  $p>0,05$ ; fig. IV. 17A). Otra evidencia del eficiente acoplamiento de los canales de calcio de tipo P/Q a la liberación de glutamato se obtuvo al observar que incluso una disminución de la  $[Ca^{2+}]$  hasta 0,1 mM un  $40,5 \pm 5,0\%$  ( $n=5$ ,  $p<0,001$ ) del componente de liberación asociado a estos canales (fig. IV. 17A). Con el fin de descartar que el distinto acoplamiento a la liberación de los canales N y P/Q pudiera ser debido a la inhibición por proteínas G (Zhang y cols., 1996; González-Inchauspe), realizamos estos mismos experimentos tras inactivar las proteínas G i/o con toxina pertúsica observando que no se afectó la dependencia a la  $[Ca^{2+}]_{ext}$  del componente N de la liberación de glutamato. Por tanto, la distinta dependencia de la  $[Ca^{2+}]_{ext}$  de la liberación mediada por canales N y P/Q parece ser una propiedad intrínseca de los canales, probablemente relacionada con una mayor distancia de los canales de tipo N a los sitios de liberación de glutamato, como indica la mayor sensibilidad a los quelantes de calcio de la liberación acoplada a este tipo de canales de calcio (fig. IV. 2) (Wu y cols., 1999).

En los botones sinápticos de los ratones que carecen de la subunidad  $\alpha_{1B}$  del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N (ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$ ), en los que toda la liberación de glutamato está controlada por canales de calcio de tipo P/Q, la liberación de glutamato inducida por KCl en presencia de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  de 1,33 mM ( $4,23 \pm 0,4$  nmol.,  $n=5$ ) fue similar a la de los animales control ( $p>0,05$ ). Como cabía esperar, dicha liberación no resultó afectada por el bloqueo con  $\omega$ -conotoxina-GVIA de los canales de calcio de tipo N ( $4,25 \pm 0,28$  nmol.,  $n=5$ ,  $p>0,05$ ) (fig. IV. 17B), pero sí fue suprimida en su totalidad tras el bloqueo de los canales de calcio de tipo P/Q con  $\omega$ -agatoxina-IVA ( $0,01 \pm 0,1$  nmol.,  $n=5$ ,  $p<0,001$ ). Por otra parte, a diferencia de lo encontrado en los botones sinápticos de ratones control, la disminución de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  de 1,33 mM a 0,5 mM no alteró la liberación de glutamato ( $4,28 \pm 0,42$  nmol.;  $n=5$ ;  $p>0,05$ ) en las terminaciones sinápticas de los animales  $\alpha_{1B}^{-/-}$ . Además, la liberación resistió la disminución de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  hasta 0,1 mM, en la que ésta se reduce hasta el  $48,4 \pm 5,6\%$  del control ( $n=5$ ;  $p<0,001$ ; fig. IV 17B). Estos datos muestran el fuerte acoplamiento a la liberación de los canales de tipo P/Q en los ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$ . La supresión mediante toxina pertúsica de la inhibición tónica por proteínas Gi/o de los canales de calcio tampoco modificó la dependencia a la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  de la liberación de glutamato en las terminaciones sinápticas de los animales  $\alpha_{1B}^{-/-}$ .



**Figura IV. 17. La presencia de PTx no modifica el peor acoplamiento de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N a la liberación de glutamato.**

Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratones adultos tanto  $\alpha_{1B} +/+$  (A) como  $\alpha_{1B} -/-$  (B) se incubaron (0,67 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) a 37°C durante 2 horas, en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína) durante la última media hora. La liberación de glutamato dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida con KCl (30 mM) se determinó en presencia de diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  extracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ ) y tras la adición de  $\omega$ -CgTx-GVIA (2  $\mu\text{M}$ , Componente P/Q) o de  $\omega$ -AgaTx-IVA (200 nM, Componente N) 100 segundos antes de despolarizar. La magnitud de los componentes de liberación en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  1,33 mM y en ausencia de toxinas fue tomada como 100%. Además, la magnitud de la liberación bajo las condiciones indicadas también se determinó tras la incubación de los sinaptosomas durante 2 horas en presencia (símbolos rellenos, línea continua) o ausencia (símbolos vacíos, línea discontinua) de PTx (1,5 mg/mL). Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 5 experimentos realizados en 5 preparaciones de sinaptosomas.

### 3.2. Los botones sinápticos con canales de calcio de tipo N presentan mayor facilitación de la liberación por ésteres de forbol.

Está ampliamente descrita la capacidad de los ésteres de forbol para potenciar la liberación de glutamato mediante diversos mecanismos entre los que se incluyen cambios en la actividad de los canales de calcio (Stea y cols., 1995) y de potasio (Zhang y cols., 2001), en el reservorio de vesículas dispuestas para la liberación (Stevens y Sullivan, 1998), en la sensibilidad de la maquinaria exocitótica al calcio (Wu y Wu, 2001), en la fosforilación de la proteína munc 18 (Wierda y cols., 2007) así como en la actividad de la proteína munc 13 (Rhee y cols., 2002). En la preparación de sinaptosomas, además de por los ésteres de forbol (Barrie y cols., 1991; Herrero y cols., 1992a), la liberación de glutamato también se incrementa por la activación de receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I (Herrero y cols., 1992b; 1994; Rodríguez-Moreno y cols., 1998). Dado que la liberación de glutamato inducida por KCl depende de la actividad de canales de calcio de tipo N y P/Q (Vázquez y Sánchez-Prieto, 1997) decidimos analizar el efecto de los ésteres de forbol sobre la liberación

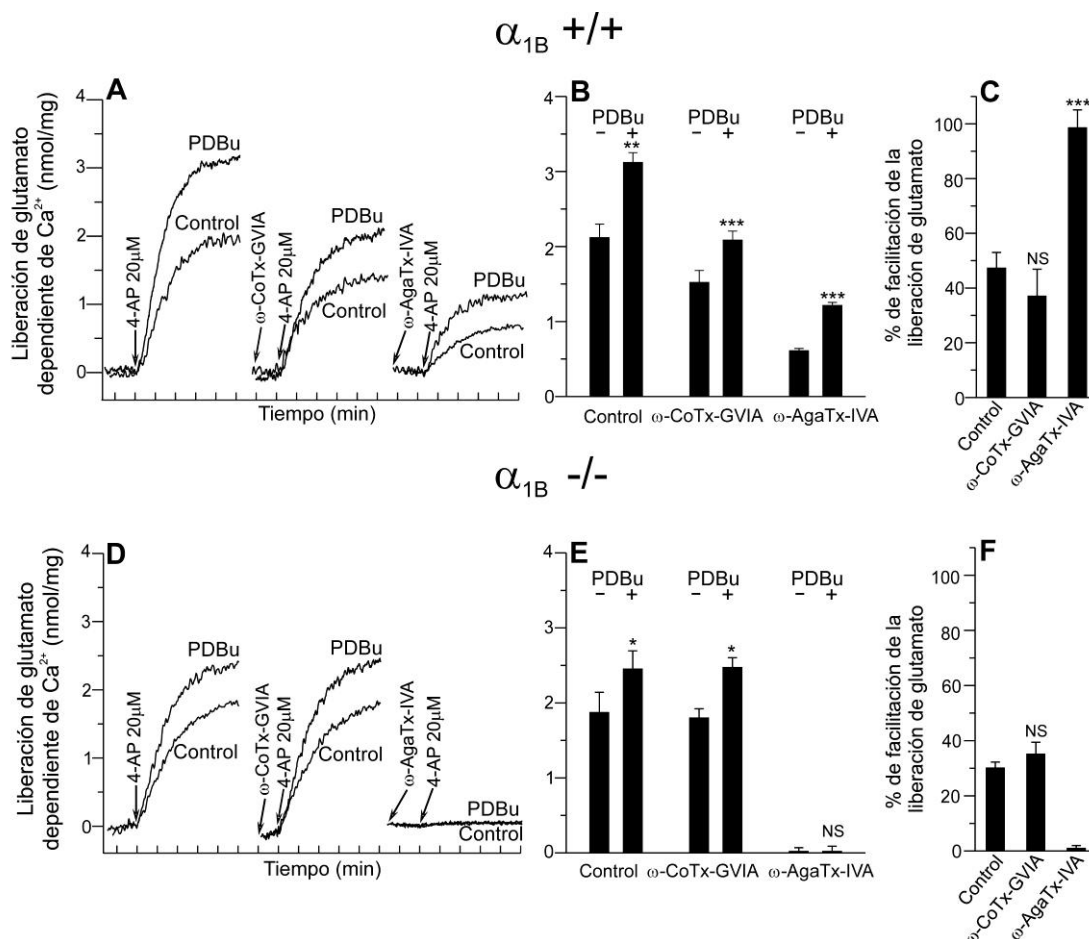
asociada a canales de calcio de tipo N, en presencia de  $\omega$ -agatoxina-IVA; así como sobre la liberación acoplada a canales de tipo P/Q, en presencia de  $\omega$ -conotoxina-GVIA.

El bloqueante de algunos canales de  $K^+$ , 4-aminopiridina (4-AP), controla la excitabilidad de la terminación sináptica y las posibles fluctuaciones del potencial de membrana (Thesleff, 1980); lo que posibilita la génesis espontánea de potenciales de acción, con la consiguiente apertura de canales de calcio dependientes de voltaje y la exocitosis de neurotransmisores (Tibbs y cols., 1989, 1996). Dado que la estimulación prolongada (5 minutos) con 4-AP 1mM causa el agotamiento completo del reservorio de vesículas de glutamato (Herrero y cols., 1996; Sistiaga y Sánchez-Prieto, 2000a, 200b), estos experimentos se realizaron con una concentración de 4-AP de 20  $\mu$ M con el fin de inducir una liberación submáxima de glutamato que permita observar el efecto potenciador de los ésteres de forbol.

En los botones sinápticos de ratones  $\alpha_{1B} +/+$ , la liberación de glutamato inducida por 4-AP 20  $\mu$ M, en ausencia de toxinas de canales de calcio, fue de  $2,12 \pm 0,18$  nmol. (n=5). Dicha liberación se redujo hasta  $1,52 \pm 0,06$  nmol. (n=5) en presencia de  $\omega$ -conotoxina-GVIA y hasta  $0,61 \pm 0,01$  nmol. (n=5) tras la adición de  $\omega$ -agatoxina-IVA (fig. IV. 18A y B). En estas mismas condiciones, el incremento neto inducido por el éster de forbol 4- $\beta$ -forbol-12, 13-dibutirato (PDBu) en la liberación fue de  $1,00 \pm 0,05$  nmol. (n=5,  $p < 0,01$ ) en ausencia de toxinas, y de  $0,56 \pm 0,06$  nmol. (n=5,  $p < 0,001$ ) y  $0,60 \pm 0,05$  nmol. (n=5,  $p < 0,001$ ), en presencia de  $\omega$ -conotoxina-GVIA ó de  $\omega$ -agatoxina-IVA, respectivamente (fig. IV 18A y B). Dado que la liberación de glutamato controlada por canales de calcio de tipo N fue menor que la controlada por canales de tipo P/Q, el grado de facilitación de la liberación acoplada a los canales N ( $99,0 \pm 0,14\%$ , n=5) fue significativamente mayor ( $p < 0,001$ ) que el de la liberación asociada a canales de calcio de tipo P/Q ( $37,0 \pm 0,18\%$ , n=5) (fig. IV. 18 C).

En los botones sinápticos de ratones  $\alpha_{1B} -/-$ , la liberación de glutamato inducida por 4-AP 20  $\mu$ M fue de  $1,87 \pm 0,17$  nmol. (n=5) en ausencia de bloqueantes de canales de calcio; de  $1,80 \pm 0,12$  nmol. (n=5) con  $\omega$ -conotoxina-GVIA y de  $0,03 \pm 0,05$  nmol. (n=5) con  $\omega$ -agatoxina-IVA (fig. IV. 18 D y E). En condiciones paralelas, el incremento neto en la liberación de glutamato producido por PDBu fue de  $0,57 \pm 0,04$  nmol. (n=5,  $p < 0,05$ ) en ausencia de toxinas, de  $0,67 \pm 0,05$  (n=5,  $p < 0,05$ ) en presencia de  $\omega$ -conotoxina-GVIA y de  $0,10 \pm 0,08$  nmol. (n=5,  $p > 0,05$ ) tras la adición de  $\omega$ -agatoxina-IVA (fig. IV. 18 D, E y F). Estos datos indican que los botones sinápticos de los

animales  $\alpha_{1B}^{-/-}$  resultaron menos susceptibles a la facilitación por ésteres de forbol ( $p < 0,05$ ) que los de ratones  $\alpha_{1B}^{+/+}$  (fig. IV. 18 C y F). Este resultado estaría en concordancia con la pérdida del componente de liberación acoplado a los canales de calcio de tipo N, que según hemos observado (fig. IV. 18 C), presenta mayor susceptibilidad a la facilitación con ésteres de forbol que el componente asociado a canales de calcio de tipo P/Q.



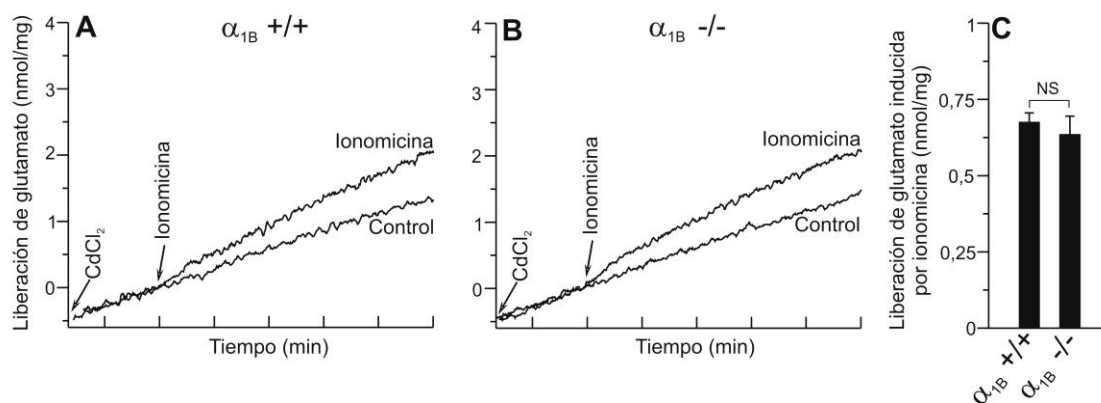
**Figura IV. 18. Los botones sinápticos de los ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$  presentan una menor potenciación de la liberación de glutamato inducida por PDBu.**

Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratones adultos  $\alpha_{1B}^{+/+}$  (A-C) y  $\alpha_{1B}^{-/-}$  (D-F) se incubaron en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína) durante media hora. La liberación de glutamato dependiente de  $Ca^{2+}$  inducida con 4-aminopiridina (4-AP) 20  $\mu$ M en presencia de  $CaCl_2$  1,33 mM se determinó en presencia o ausencia (control) de PDBu 1  $\mu$ M añadido 40 s. antes de despolarizar, y tanto en presencia como en ausencia (control) de las toxinas de canales de  $Ca^{2+}$   $\omega$ -CoTx-GVIA (2  $\mu$ M) o  $\omega$ -AgaTx-IVA (200 nM) añadidas 100 s. antes que 4-AP. Los histogramas B y E muestran la liberación acumulada tras 5 min. de despolarización bajo las condiciones mencionadas. Los histogramas C y F representan la facilitación inducida por PDBu (%) asociada con los canales tipo N y P/Q. Se tomó como 100% el valor correspondiente en ausencia de PDBu. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 5-6 experimentos realizados en 5-6 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores en ausencia de PDBu (paneles B y E) o con los valores en ausencia de las toxinas de canales de  $Ca^{2+}$  (histogramas C y F) mediante el test de la *t* de Student: NS  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.3. La pérdida del canal de calcio de tipo N no alteró la sensibilidad al calcio de la maquinaria exocitótica.

Para analizar las posibles diferencias en la sensibilidad al calcio de la maquinaria exocitótica entre ratones control y ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$  se requerían unas condiciones de ensayo en las que la liberación de glutamato fuera independiente de la apertura de los canales de calcio. Para ello, recurrimos al ionóforo de calcio ionomicina, que se inserta en la membrana plasmática originando poros por los que el calcio extracelular accede a la maquinaria exocitótica provocando una liberación de glutamato independiente de la actividad de los canales de calcio (Jovanovic y cols., 2000). No obstante, para evitar una apertura espontánea de los canales de calcio dependientes de voltaje, los ensayos de liberación de glutamato se llevaron a cabo en presencia del bloqueante inespecífico de canales de  $Ca^{2+}$ ,  $CdCl_2$  30  $\mu M$ .

La liberación basal de glutamato fue de  $1,31 \pm 0,03$  nmol. (n=5) en los botones sinápticos de los animales control y de  $1,44 \pm 0,11$  nmol. en las terminaciones sinápticas de ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$ . Dicha liberación se incrementó en presencia de ionomicina 2  $\mu M$ , tanto en animales control ( $0,67 \pm 0,03$  nmol., n=7) como en ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$  ( $0,64 \pm 0,06$  nmol., n=10;  $p > 0,05$ ) (fig. IV. 19A, B y C). Por tanto, podemos pensar que las maquinarias exocitóticas de las terminaciones sinápticas de los ratones  $\alpha_{1B}^{+/+}$  y  $\alpha_{1B}^{-/-}$  presentan una sensibilidad al calcio similar.



**Figura IV. 19. Los botones sinápticos de los ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$  no presentan alteraciones en la sensibilidad al  $Ca^{2+}$  de la maquinaria exocitótica.**

Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratones  $\alpha_{1B}^{+/+}$  (A) y  $\alpha_{1B}^{-/-}$  (B) se incubaron durante media hora en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína). La liberación de glutamato se determinó en presencia de  $[Ca^{2+}]_{ext} 1,33mM$  y de  $CdCl_2$  30  $\mu M$  para bloquear todos los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, y en presencia y ausencia (control) del inóforo ionomicina (2 $\mu M$ ). El histograma C muestra la magnitud de la liberación inducida por ionomicina durante 5 minutos en sinaptosomas de ratones  $\alpha_{1B}^{+/+}$  y  $\alpha_{1B}^{-/-}$ . Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 5-10 experimentos realizados en 5-10 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores de los ratones  $\alpha_{1B}^{+/+}$  mediante el test de la  $t$  de Student:  $^{NS}p > 0,05$ .



#### 4. Facilitación de la liberación de glutamato por mGluR7.

Como ya se ha descrito, el receptor mGlu7 pertenece al grupo III de los receptores metabotrópicos de glutamato, que se localizan en la zona activa presináptica (Shigemoto y cols., 1996) donde actúan como autorreceptores que inhiben la liberación de glutamato (Forsythe y Clements, 1990; Gereau y Conn, 1995; Herrero y cols., 1996). El mecanismo de señalización puesto en marcha por mGluR7 para inhibir la liberación de neurotransmisor implica la activación de proteínas Gi/o que inhiben la actividad de los canales de calcio activados por voltaje y de la adenilato ciclasa (Millán y cols., 2002a) así como de la propio proceso de exocitosis (Blackmer y cols., 2005).

Sin embargo, la señalización de mGluR7 no se restringe a estas vías. Así, también se sabe que receptores mGlu7 transfectados en células granulares de cerebelo inhiben corrientes de calcio somáticas mediante un mecanismo que implica la activación de PLC y la hidrólisis de fosfatidilinositol (4, 5)-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) para producir inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). De este modo, el primero provoca la liberación de calcio de los reservorios intracelulares, mientras el segundo activa a la proteína quinasa C (PKC) (Perroy y cols., 2000). Sin embargo, se desconoce si los receptores mGlu7 endógenos, expresados en su localización natural, la zona activa presináptica, también activan esta vía de señalización de PLC así como la repercusión de la misma en la liberación de glutamato.

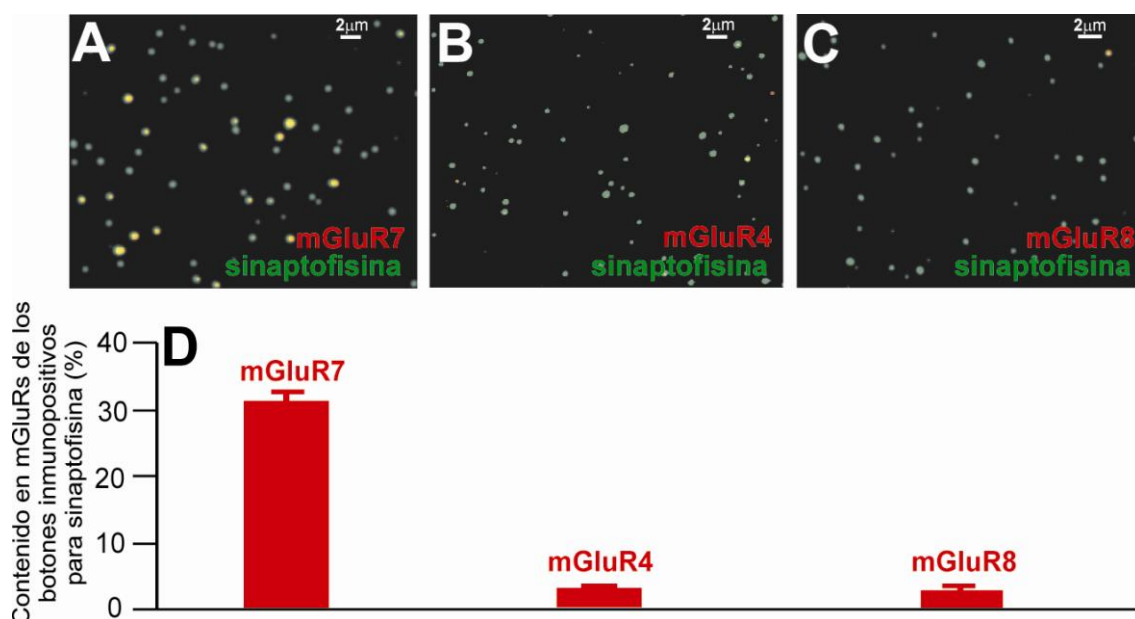
Está ampliamente descrito que los ésteres de forbol, análogos estables del producto endógenos de PLC, DAG, potencian la transmisión sináptica mediante el aumento de la liberación de neurotransmisor (Herrero y cols., 1992a; Parfitt y cols., 1993; Stea y cols., 1995; Zhang y cols., 2001; Stevens y Sullivan, 1998; Wu y Wu, 2001; Rhee, 2001; Wierda y cols., 2007). Durante mucho tiempo, se ha mantenido que la señalización por DAG en las sinapsis estaba mediada fundamentalmente por la acción de PKC sobre la actividad de canales de calcio y potasio así como sobre proteínas de la maquinaria exocitótica. Aparte de la activación de PKC, se ha descrito que los ésteres de forbol también pueden activar la proteína munc 13-1, una proteína presináptica que juega un papel esencial en la preparación de vesículas para su liberación (Betz y cols., 1998; Rhee y cols., 2002).

*A priori* se podría pensar que un receptor presináptico capaz de activar PLC, debería potenciar la liberación de glutamato ya que, en neuronas de hipocampo, la activación de la PLC presináptica por estimulación de alta frecuencia resulta en la potenciación sináptica debida al aumento en la

liberación de neurotransmisor (Rosenmund y cols., 2002). Por otro lado, la estimulación de alta frecuencia debe producir un incremento en la liberación de glutamato suficiente para activar receptores de baja afinidad como mGluR7 (Pelkey y cols., 2005), por tanto, parece razonable pensar que dichos receptores podrían activar a la PLC presináptica y mediar así el incremento de la liberación de glutamato. Por ello, decidimos analizar si, en una preparación de botones sinápticos de corteza cerebral, donde ya hemos establecido que mGluR7 inhibe la liberación de glutamato, el receptor también tiene la capacidad de desencadenar una vía de señalización que conduzca a la facilitación de la liberación de neurotransmisor.

#### **4.1. La exposición prolongada al agonista L-AP4 hizo patente una respuesta facilitadora mediada por mGluR7.**

Para analizar las vías de señalización activadas por mGluR7 en las terminaciones sinápticas de corteza cerebral de rata adulta, primero determinamos la expresión de este receptor. Para ello, se realizaron experimentos de inmunocitoquímica con sinaptosomas fijados en cubreobjetos y doblemente marcados con anticuerpos frente a la proteína vesicular sinaptofisina, así como frente a los receptores metabotrópicos de glutamato sensibles a L-AP4 que se expresan en el cerebro (4, 7 y 8). De este modo, del total de botones sinápticos que contenían sinaptofisina (1.148 partículas de 7 campos), un  $30,0 \pm 1,2\%$  (media  $\pm$  error típico) de los mismos también resultó inmunopositivo para isoforma del receptor mGluR7a (fig. IV. 20A y D) mientras que sólo un  $1,4 \pm 0,5\%$  (de 1.616 partículas de 8 campos analizados) y un  $1,6 \pm 0,6\%$  (de 989 partículas de 8 campos analizados) resultaron inmunorreactivas para mGluR4a y mGluR8a, respectivamente (fig. IV. 20B, C y D). Por tanto, podemos afirmar que las respuestas a L-AP4 en esta preparación de terminaciones nerviosas están mediadas principalmente por mGluR7.



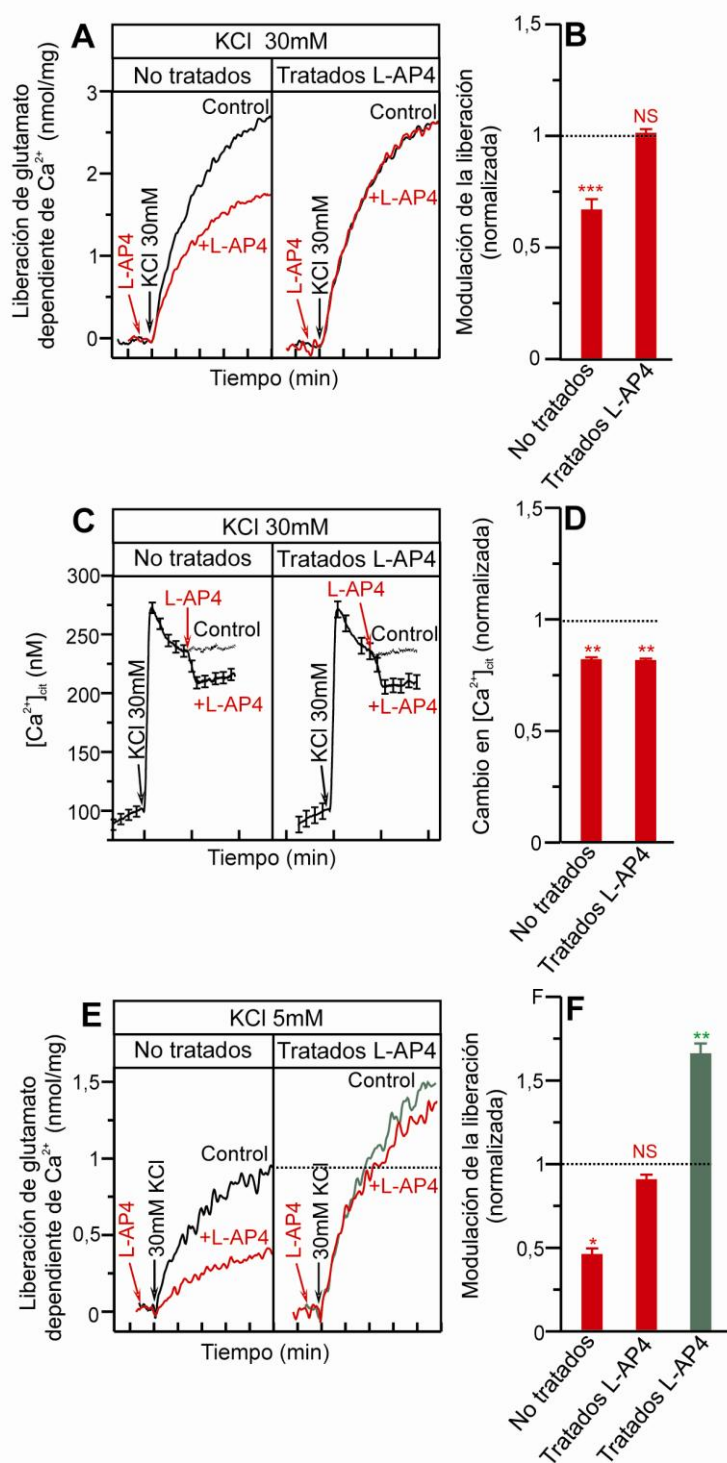
**Figura IV. 20. mGluR7 es el único receptor mGluR del grupo III que se expresa en abundancia en la preparación de sinaptosomas de corteza cerebral de rata adulta.**

Los sinaptosomas de corteza cerebral de rata se incubaron (2 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) a 37°C durante 1 hora; para después ser fijados sobre cubreobjetos tratados con polilisina y teñidos con anticuerpos policlonales de conejo contra mGluR7a (1 μg/ml) (A) o con anticuerpos policlonales de cobaya frente a mGluR4a (1 μg/ml) (B) o mGluR8a (1 μg/ml) (C), y contra el marcador vesicular sinaptofisina. La localización de los anticuerpos se visualizó con los fluorocromos Cy3 para mGluR4a, 8a y 7a Cy2 para sinaptofisina. El histograma D muestra el contenido relativo (%) en receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III de los botones sinápticos inmunopositivos para sinaptofisina. La barra corresponde a una escala de 2 μm. Para cada doble experimento inmunocitoquímico se analizaron 7-8 campos obtenidos de 4-6 preparaciones de botones sinápticos.

Como ya hemos visto, la despolarización de las terminaciones sinápticas con KCl aumenta la entrada de calcio por los canales dependientes de voltaje y la liberación de glutamato (Millán y cols., 2002a). Así, en los sinaptosomas control (no tratados), la liberación de glutamato inducida con KCl 30 mM ( $2,7 \pm 0,1$  nmol. de glu. / mg de proteína  $\pm$  error típico;  $n=6$ ) se redujo hasta un  $66,7 \pm 5\%$  del valor control tras una exposición aguda (30 segundos) al agonista L-AP4 1mM ( $n=6$ ;  $p<0,001$ ; fig. IV 21A y B). Paralelamente, la misma exposición aguda al agonista también redujo la entrada de calcio inducida con KCl 30 mM hasta el  $81,8 \pm 1,2\%$  de los valores control ( $n=8$ ;  $p<0,01$ ; fig. IV. 21C y D). En cambio, en los sinaptosomas previamente expuestos a L-AP4 1mM durante 10 minutos, después de centrifugarlos y resuspenderlos de nuevo para eliminar el agonista, no se observó reducción de la liberación inducida con KCl ( $97,0 \pm 2,0\%$  de la liberación control;  $n=8$ ;  $p>0,05$ ; fig. IV. 21A y B). A primera vista, esta pérdida de la respuesta de mGluR7 podría deberse a un fenómeno de desensibilización dependiente de actividad (Pelkey y cols., 2005, 2007; Jovanovic y cols., 2000). Sin embargo, en los botones sinápticos pretratados con

L-AP4 y cargados con la sonda fura 2-AM para determinar los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ ), se observó que el descenso en la entrada de calcio tras la segunda exposición aguda al agonista fue similar al de los sinaptosomas sin tratar ( $81,40 \pm 1\%$ ;  $n=8$ ;  $p<0,01$ ; fig. IV. 21 C y D). Por tanto, mGluR7 continúa presente en la membrana tras la exposición prolongada al agonista, descartando así que el fallo en la respuesta inhibitoria sea una consecuencia de la internalización del receptor.

La pérdida de inhibición de la liberación de glutamato, aun cuando se mantiene la reducción de la entrada de calcio se podría explicar por la aparición de una nueva respuesta del receptor, que facilitaría la liberación contrarrestando así el efecto inhibitor de una reducción en la entrada de calcio. Dado que las condiciones del ensayo de liberación, la estimulación sostenida con KCl 30 mM durante 5 minutos, producen una liberación de glutamato máxima que impide observar efecto facilitador alguno; decidimos usar una estimulación submáxima que nos permitiera detectar una potenciación de la liberación. Estimulando con KCl 5 mM, se observó una liberación de ( $0,9 \pm 0,11$  nmol.,  $n=6$ , fig. IV 21 E y F) en los sinaptosomas no tratados, que se redujo hasta el  $45,8 \pm 4\%$  de los valores control tras la exposición aguda a L-AP4 ( $n=6$ ;  $p<0,05$ ). Por el contrario, en los sinaptosomas previamente expuestos a L-AP4 durante 10 minutos, la liberación de glutamato resultó potenciada hasta el  $165,8 \pm 6,4\%$  ( $n=6$ ;  $p<0,01$ ). Además, en esta preparación de sinaptosomas expuestos a L-AP4, una segunda adición de L-AP4 no inhibió la liberación de glutamato ( $90,5 \pm 3,1\%$  de los valores control;  $n=6$ ;  $p>0,05$ ); confirmando que la exposición prolongada a L-AP4 promueve una nueva respuesta del receptor que aumenta la liberación y que, por tanto, contrarresta la inhibición de la liberación debida la reducción de la entrada de calcio.



**Figura IV. 21. El tratamiento prolongado con L-AP4 desenmascara la capacidad de mGluR7 para potenciar la liberación de glutamato.**

Los sinaptosomas de corteza cerebral de rata adulta se incubaron durante media hora en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína). Liberación de glutamato inducida con KCl 30 mM (A y B) o KCl 5mM (C y D) en presencia de  $[Ca^{2+}]_{ext}$  1,33mM. (G y H), concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  libre ( $[Ca^{2+}]_{cit}$ ) en presencia de  $[Ca^{2+}]_{ext}$  1,33mM. La liberación de glutamato y el cambio en  $[Ca^{2+}]_{cit}$  se determinaron tanto en sinaptosomas incubados con L-AP4 1mM durante 10 minutos y después lavados mediante centrifugación y resuspensión para eliminar el agonista (Tratados L-AP4), como en sinaptosomas no tratados, en los que se procedió de igual forma pero en ausencia de agonista. (B), inhibición de la liberación tras la adición de L-AP4 1mM 30 s. antes de despolarizar (en rojo). Los valores de inhibición se normalizaron respecto a la liberación inducida por KCl en ausencia (No tratados) o en presencia (Tratados L-AP4) de agonista, tomada como control. (C), La  $[Ca^{2+}]_{cit}$  alcanzada tras un minuto de despolarización con KCl se tomó como control tanto para los terminales no tratados como tratados con L-AP4. (D), efecto de la adición de L-AP4 en la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  representado como una fracción de los valores control (trazo discontinuo). (F), inhibición por L-AP4 de la liberación (en rojo) normalizado respecto a la liberación inducida por KCl 5mM en ausencia de L-AP4 tanto para los botones no tratados como para los tratados con L-AP4. En los experimentos de facilitación (en verde), se tomó como control la liberación inducida por KCl 5mM en los sinaptosomas no tratados y los datos se representaron como comparaciones con el control.

## 4.2. Farmacología de la potenciación inducida por L-AP4.

Dado que L-AP4 origina una respuesta inhibitoria por bloqueo de la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje, para analizar la nueva respuesta facilitadora inducida por L-AP4 libre de interferencias con la respuesta inhibitoria, usamos el ionóforo de calcio ionomicina, que se inserta en la membrana plasmática permitiendo la entrada de calcio y la consiguiente despolarización de forma independiente de la actividad de los canales de calcio (Jovanovic y cols., 2000).

En estas condiciones, primero analizamos la influencia del tiempo de pretratamiento con L-AP4 necesario para obtener una potenciación óptima de la liberación. Así, aunque tras 4 minutos de pretratamiento con el agonista el incremento en la liberación ya se hizo patente, la potenciación máxima requería al menos 10 minutos de exposición a L-AP4 1 mM, por lo que este tiempo de pretratamiento se adoptó como protocolo estándar (fig. IV. 22 A). En estas condiciones, la liberación inducida por ionomicina en los botones sinápticos sin tratar ( $0,65 \pm 0,01$  nmol. de glutamato por mg. de proteína) se incrementó hasta  $1,1 \pm 0,05$  nmol tras el pretratamiento con L-AP4 1mM durante 10 minutos ( $n=26$ ;  $p<0,001$ ; fig. IV. 22B). También estudiamos el tiempo que persistía la potenciación inducida por L-AP4 tras la retirada del agonista mediante lavado, observando que, sorprendentemente, la respuesta facilitadora se mantiene incluso después de la retirada del agonista ( $185,6 \pm 9,7\%$  respecto a los sinaptosomas sin tratar;  $n=4$ ;  $p<0,001$ ). Incluso dos horas después del tratamiento con L-AP4 aún pudimos observar un incremento significativo de la liberación de glutamato ( $146,0 \pm 3,2\%$ ;  $n=4$ ;  $p<0,01$ ; datos no mostrados). Por tanto, parece que la facilitación de la liberación inducida por L-AP4 es un proceso de potenciación duradera.

La potenciación de la liberación mediada por mGluR7 sólo se observó con concentraciones de ionomicina que producen una liberación submáxima (de 2 hasta 6  $\mu$ M, fig. IV. 22C), mientras que a concentraciones de ionomicina mayores (15  $\mu$ M) esta potenciación no se produjo ( $99,9 \pm 1,6\%$  de los valores en los sinaptosomas sin tratar;  $n=5$ ;  $p>0,05$ ). Esto sugiere que tasas altas de liberación ocuyen la acción potenciadora.

A continuación, realizamos la caracterización farmacológica de la facilitación inducida por L-AP4 y observamos que, en efecto, se trataba de una respuesta mediada por receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III ya que fue suprimida con el antagonista específico para los receptores de este grupo, (RS)- $\alpha$ -ciclopropil-4-fosfono-fenilglicina (CPPG;  $100,4 \pm 5,3\%$  de los

valores de las terminaciones sin tratar;  $n=8$ ;  $p>0,05$ ; fig. IV. 20 D). Para confirmar los resultados inmunocitoquímicos que mostraban que la respuesta facilitadora se debe a la activación de un receptor de baja afinidad por glutamato, como mGlu7 (Okamoto y cols., 1994), y no a otros receptores con más afinidad por el agonista, como mGlu4 y mGlu8, determinamos la liberación inducida con ionomicina tras 10 minutos de pretratamiento con L-AP4 20  $\mu$ M, concentración suficiente para activar a estos receptores pero insuficiente para activar mGlu7 (Conn y Pin, 1997; Schoepp y cols., 1999; Cartmell y Schoepp, 2000; Millán y cols., 2002). En estas condiciones, no se observó potenciación de la liberación ( $99,0 \pm 4,0\%$  respecto a los botones sinápticos en ausencia de pretratamiento;  $n=4$ ;  $p>0,05$ ; fig. IV. 22 A) lo que, en efecto, confirma que esta potenciación de la liberación está mediada por mGluR7.

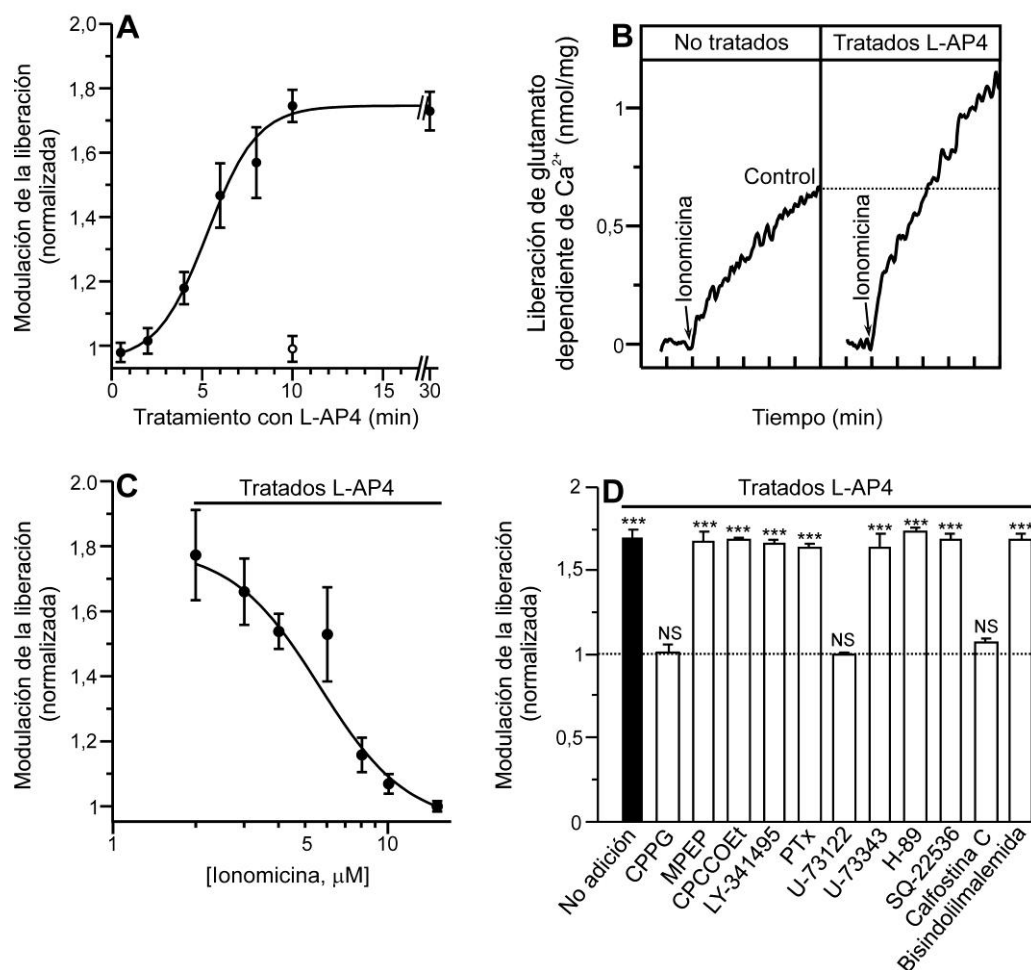
Por otra parte, que la potenciación inducida por L-AP4 fuera un efecto indirecto, debido a la activación de mGluR del grupo I por el glutamato liberado, ya que ni el antagonista de mGluR5, 2-metil-6(feniletinil) piridina (MPEP) ni el antagonista de mGluR1, ester de 7(hidroximino) ciclopropa[b]cromo-1a- carboxilato de etil (CPCCOEt) afectaron a la respuesta facilitadora ( $167,0 \pm 6,2\%$ ;  $n=4$ ;  $p<0,001$  y  $168,1 \pm 1,5\%$ ;  $n=4$ ;  $p<0,001$ ; respectivamente). Tampoco tuvo efecto alguno sobre la facilitación el antagonista de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo II, LY-341495 ( $166,5 \pm 3,4\%$ ;  $n=4$ ;  $p<0,001$ ; fig. IV. 22D).

Analizamos el efecto de la toxina pertúsica sobre la potenciación inducida por L-AP4 y observamos que, a diferencia de la respuesta inhibitoria (Millán y cols., 2002) (fig. IV. 3B), la respuesta facilitadora resultó insensible a PTx ( $163,5 \pm 3,5\%$ ;  $n=8$ ;  $p<0,001$ ; fig. IV. 22D). Por tanto, la facilitación inducida por L-AP4 no está mediada por proteína G i/o. Como control positivo de la acción de la toxina, realizamos experimentos en paralelo en los que la liberación mediada por GABA<sub>B</sub> (Ladera y cols., 2008) fue suprimida por la toxina pertúsica ( $32,2 \pm 5,7\%$ ;  $n=3$  y  $4,7 \pm 3,1\%$ ;  $n=3$  en ausencia y en presencia de la toxina, respectivamente; datos no mostrados).

Cabe destacar que la facilitación mediada por L-AP4 fue suprimida en su totalidad por el inhibidor de fosfolipasa C, U-73122 ( $100,3 \pm 0,9\%$  de los valores en los sinaptosomas sin tratar con L-AP4;  $n=7$ ;  $p>0,05$ ; fig. IV. 22 D) pero no por su análogo inactivo, U-73343 ( $164,1 \pm 8,2\%$ ;  $n=8$ ;  $p<0,001$ ). Sin embargo, la respuesta facilitadora no resultó afectada ni por el inhibidor de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), H-89 ( $173,0 \pm 3,1\%$ ;  $n=8$ ;  $p<0,001$ ) ni por el inhibidor de la adenilato ciclasa SQ-22536 ( $168,5 \pm 4,0\%$ ;  $n=8$ ;  $p<0,001$ ). Por otro lado, también estudiamos si la potenciación de la liberación era sensible a los inhibidores de proteína quinasa C (PKC) y, sorprendentemente, la

facilitación no resultó afectada por bisindolilmaleimida ( $168,2 \pm 4,3\%$ ;  $n=6$ ;  $p<0,001$ ), un inhibidor específico de PKC que impide la unión del ATP, sin embargo, la respuesta fue suprimida por calfostina C ( $106,9 \pm 3,2\%$ ;  $n=6$ ;  $p>0,05$ ), un inhibidor que actúa a nivel del sitio de unión de diacilglicerol y que, por tanto, no solo inhibe a la PKC sino también proteínas no quinasas que unen DAG como son las proteínas munc 13 (Brose y Rosenmund, 2002). Estos resultados sugieren una implicación de estas últimas en la potenciación inducida por mGluR7.





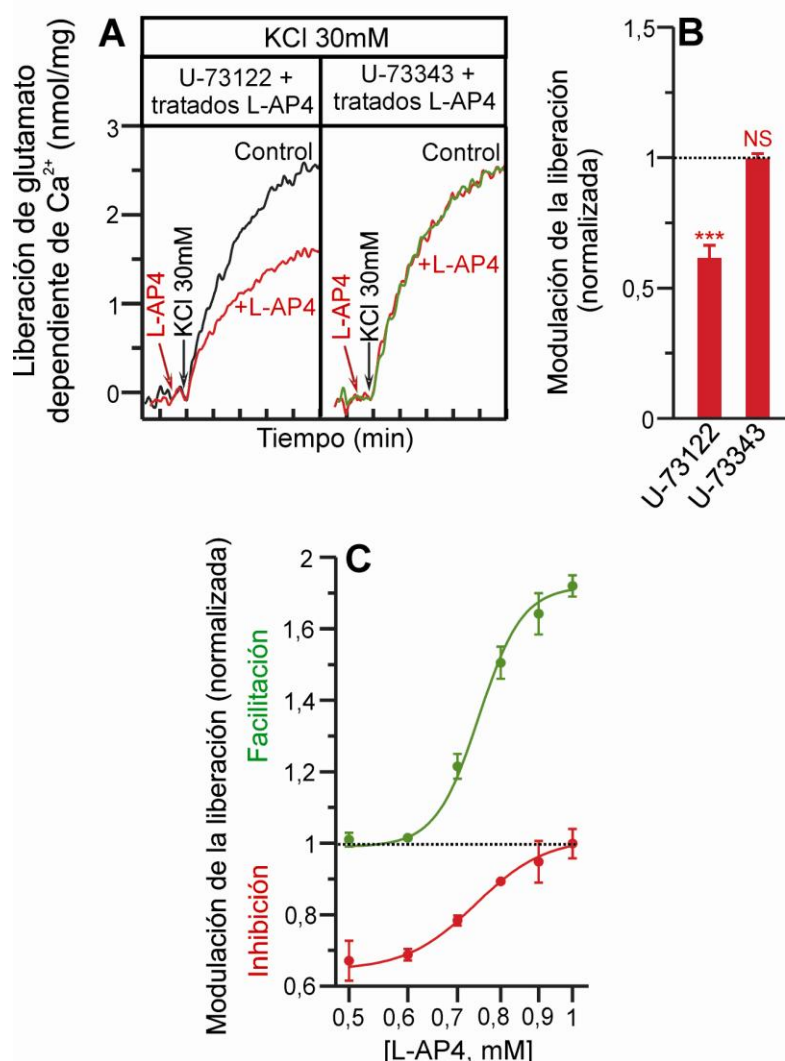
**Figura IV. 22. Farmacología de la potenciación inducida por L-AP4.**

Los sinaptosomas de corteza cerebral de rata adulta se incubaron media hora en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína). (A) Curso temporal de la facilitación de la liberación inducida por el pretratamiento con L-AP4. Los sinaptosomas fueron expuestos a L-AP4 1mM durante los tiempos indicados para después eliminar el agonista mediante el lavado por centrifugación y resuspensión. A continuación, se determinó la liberación de glutamato inducida con ionomicina 2 mM y se representó como una normalización respecto a los valores de los botones no tratados (símbolos rellenos). El símbolo sin relleno muestra la facilitación de la liberación tras un tratamiento de 10 minutos con L-AP4 20 mM. (B) Liberación de glutamato inducida con ionomicina 2mM en presencia de  $[Ca^{2+}]_{ext}$  1,33 mM tanto en sinaptosomas no tratados como tratados con L-AP4 1mM durante 10 minutos. (C) Facilitación de la liberación inducida con diferentes concentraciones de ionomicina en sinaptosomas tratados con L-AP4. Los datos se representaron como una normalización de su respectivo control, que fue la liberación inducida con cada concentración de ionomicina en sinaptosomas no tratados. (D) Farmacología de la potenciación de la liberación inducida por L-AP4. La liberación de glutamato inducida por ionomicina 2 mM se determinó en sinaptosomas tratados con L-AP4 en presencia de fármacos añadidos previamente a ionomicina a los diferentes tiempos y concentraciones indicados a continuación: antagonista de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III, CPPG (15 min., 100 $\mu$ M); toxina pertúsica (2 h., 1,5 $\mu$ g/ml); inhibidor activo de PLC, U-72122 (30 min., 2 $\mu$ M); análogo inactivo del inhibidor de PLC, U-73343 (30 min., 2 $\mu$ M); inhibidor de PKA, H-89 (30 min., 10 $\mu$ M); inhibidor de adenilato ciclasa, SQ-22536 (30 min., 10 $\mu$ M) y los inhibidores de PKC, calfofistina C (30 min.; 0,1 $\mu$ M) y bisindolilmaleimida (30 min., 1 $\mu$ M). Los datos del efecto de cada fármaco se representaron como una normalización respecto al control, que fue la liberación de glutamato inducida por ionomicina (2 $\mu$ M) en sinaptosomas no tratados con L-AP4. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 6-8 experimentos realizados en 6-8 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores control correspondientes mediante el test de la *t* de Student: <sup>NS</sup> $p > 0,05$  y <sup>\*\*\*</sup> $p < 0,001$ .

### 4.3. La modulación de la liberación por mGluR7 es un balance entre sus acciones inhibitoras y facilitadoras.

Dado que la facilitación de la liberación por exposición prolongada a L-AP4 contrarresta el efecto inhibitorio de una segunda estimulación aguda, a pesar de que la entrada de calcio se encuentra disminuida (fig. IV. 21 A-D), cabe esperar que el bloqueo farmacológico de la vía facilitadora ha de permitir la recuperación de la respuesta inhibitora tras una segunda adición de L-AP4. De este modo, la inhibición de la liberación por la segunda adición de L-AP4 permaneció intacta en sinaptosomas pretratados con L-AP4 en presencia del inhibidor de PLC, U-73122 ( $61,5 \pm 4,9\%$  del control;  $n=5$ ;  $p<0,001$ ; fig. IV. 23 A y B). Sin embargo, el pretratamiento con L-AP4 en presencia del inhibidor de PLC inactivo, U-73343, tuvo como resultado la pérdida de inhibición tras una segunda adición de L-AP4 ( $99,2 \pm 1,9\%$  del control;  $n=5$ ;  $p>0,05$ ).

Si la facilitación mediada por L-AP4 contrarresta la inhibición de la liberación, cabe esperar que cambios en la magnitud de la respuesta facilitadora afecten a la magnitud de la respuesta inhibitora. De manera que, pretratando los sinaptosomas con concentraciones crecientes de L-AP4 (desde 0,5 hasta 1 mM) cabría esperar una respuesta facilitadora gradual. Analizamos la facilitación con ionomicina  $2\mu\text{M}$  y la inhibición con KCl 30 mM. El pretratamiento con L-AP4 1mM potenció la liberación hasta un  $172,0 \pm 3,0\%$  ( $n=5$ ;  $p<0,001$ ) suprimiendo completamente la inhibición en respuesta a una segunda adición de agonista ( $100,1 \pm 4,1\%$ ;  $n=5$ ;  $p>0,05$ ; fig. IV. 23 C). En cambio, en botones sinápticos tratados con concentraciones de L-AP4 inferiores a 1 mM, la facilitación de la liberación inducida con ionomicina fue descendiendo para dar paso a una recuperación progresiva de la inhibición de la liberación tras la segunda adición de L-AP4 hasta llegar a la pérdida de la facilitación ( $101,0 \pm 1,9\%$ ;  $n=5$ ;  $p>0,05$ ) y a una respuesta inhibitora máxima ( $67,1 \pm 5,6\%$  del control;  $n=5$ ;  $p<0,001$ ) cuando los sinaptosomas se pretrataron con L-AP4 0,5 mM. Estos resultados indican que la facilitación inducida por mGluR7 controla la magnitud de la inhibición de la liberación.



**Figura IV. 23. La modulación de la liberación por mGluR7 es un balance entre facilitación e inhibición.**

Los sinaptosomas de corteza cerebral de rata adulta se incubaron durante media hora en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína) así como con el inhibidor de PLC, U-73122 (2 $\mu$ M) o con su análogo inactivo, U-73343 (2 $\mu$ M) (A y B). Además, los sinaptosomas fueron expuestos a L-AP4 1mM (A y B, Tratados L-AP4) o a diferentes concentraciones del mismo (0,5-1mM, panel C). Después, se eliminó el agonista mediante lavado por centrifugación y resuspensión. (A) liberación de glutamato dependiente de calcio inducida con KCl 30mM en presencia de  $[Ca^{2+}]_{ext}$  1,33 mM tanto en ausencia como en presencia (en rojo) de una segunda adición de L-AP4 1mM (A, B y C). (B) inhibición de la liberación tras la segunda adición de L-AP4 tomando como control la liberación en ausencia de L-AP4. (C), los sinaptosomas fueron pretratados (10 min) con L-AP4 0,5-1mM para luego cuantificar tanto la facilitación de la liberación inducida por ionomicina 2 $\mu$ M como la inhibición de la liberación de glutamato inducida por KCl 30 mM, tras una segunda adición de L-AP4 1 mM. En los experimentos de facilitación (en verde), los datos se representan normalizados respecto a su control, que fue la liberación inducida por ionomicina en sinaptosomas no tratados. En los experimentos de inhibición (en rojo), el control fue la liberación inducida por KCl 30 mM en los terminales no tratados. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 4-8 experimentos realizados en 4-8 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores control correspondientes mediante el test de la *t* de Student: <sup>NS</sup> $p > 0,05$  y <sup>\*\*\*</sup> $p < 0,001$ .

#### 4.4. La estimulación prolongada de mGluR7 incrementó los niveles de inositol monofosfato (IP<sub>1</sub>).

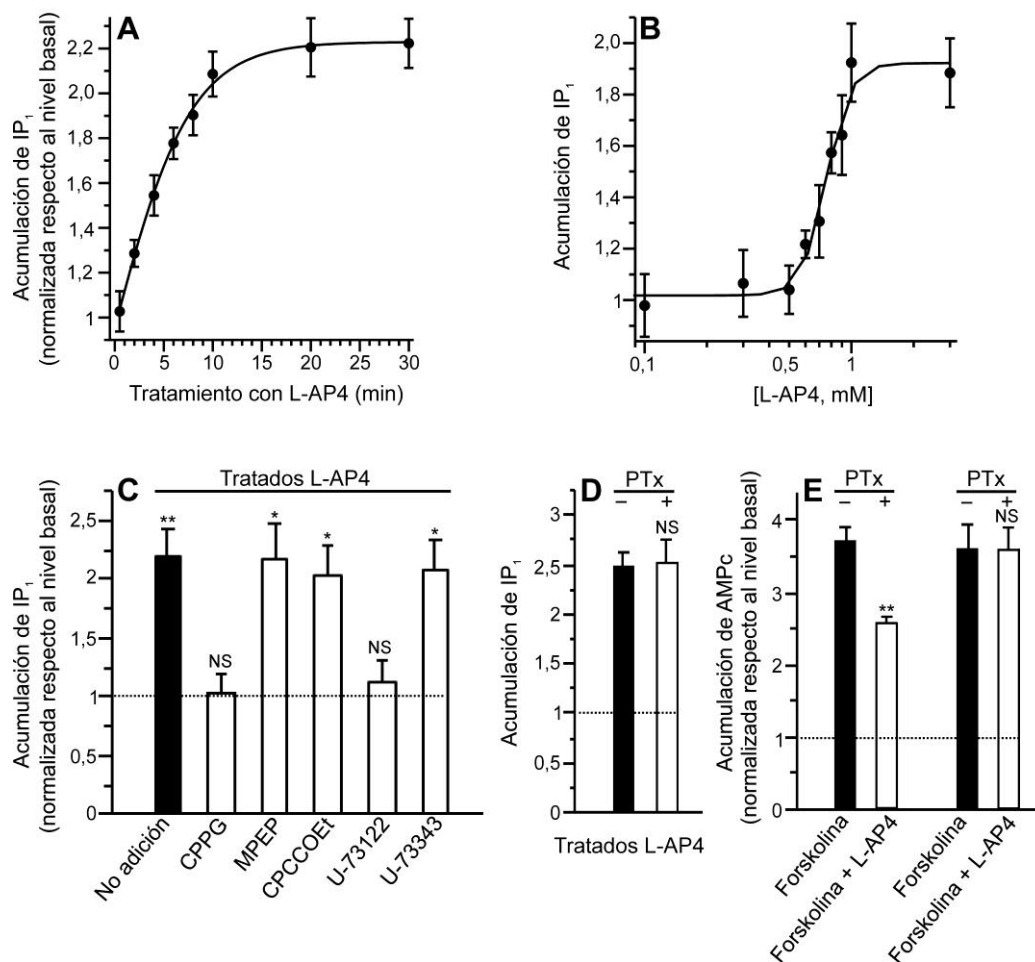
Dado que la facilitación mediada por L-AP4 fue suprimida con el inhibidor de PLC (fig. IV. 22D), analizamos si la hidrólisis de fosfoinosítidos y la consiguiente formación de diacilglicerol (DAG) e D-mio-inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) estaba implicada en esta respuesta facilitadora. La detección de la formación transitoria de IP<sub>3</sub> es difícil, en su lugar hemos analizado la acumulación de D-mio-inositol 1-monofosfato, un producto del metabolismo de IP<sub>3</sub>, que se acumula en las células tras la inhibición de la inositol monofosfatasa con LiCl. Esta determinación de IP<sub>1</sub> se ha utilizado previamente para medir la actividad de los receptores metabotrópicos acoplados a PLC (Trinquet y cols., 2006).

Primero determinamos el curso temporal de la acumulación de IP<sub>1</sub> a distintos tiempos de pretratamiento con L-AP4 observando que, igual que la facilitación de la liberación (fig. IV. 22 A), la respuesta máxima requería exposiciones a L-AP4 1mM de entre 10 y 20 minutos (fig. IV. 24 A). Fijando la exposición a 20 minutos, L-AP4 incrementó la acumulación de IP<sub>1</sub> de forma dosis dependiente; observándose que sólo altas concentraciones del agonista producían una acumulación significativa de IP<sub>1</sub> (fig. IV. 24 B). La acumulación de IP<sub>1</sub> inducida por L-AP4 no es un efecto indirecto mediado por receptores metabotrópicos del grupo I ya que, ni el antagonista del receptor mGlu5, MPEP, ( $217,2 \pm 30,7\%$  respecto al nivel basal;  $n=4$ ;  $p<0,05$ ) ni el antagonista del receptor mGlu1, CPCCOEt, ( $203,1 \pm 26,0\%$ ;  $n=4$ ;  $p<0,05$ ) (fig. IV. 24 C) redujeron esta respuesta. Sin embargo, la respuesta fue totalmente suprimida por el antagonista de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III, CPPG, ( $101,9 \pm 17,0\%$ ;  $n=8$ ;  $p>0,05$ ).

Como cabía esperar, el inhibidor de PLC, U-73122 bloqueó por completo la acumulación de IP<sub>1</sub> ( $113,4 \pm 18,7\%$ ;  $n=4$ ;  $p>0,05$ ) mientras que su análogo inactivo, U-73343, no tuvo efecto alguno ( $207,7 \pm 24,8\%$ ;  $n=4$ ;  $p<0,05$ ) (fig. IV. 24 C).

También, en analogía a la facilitación de la liberación (fig. IV. 22 D), la acumulación de IP<sub>1</sub> mediada por L-AP4 resultó insensible a la toxina pertúsica ( $248,5 \pm 12,7\%$ ;  $n=4$ ;  $p<0,05$  y  $250,7 \pm 24,8\%$ ;  $n=4$ ;  $p<0,05$  en ausencia y en presencia PTx, respectivamente, fig. IV. 24 D). En este caso, como control positivo para asegurar el funcionamiento de la toxina analizamos la sensibilidad a PTx de la reducción por L-AP4 de los niveles de AMPc estimulados con forskolina. El incremento en los niveles de AMPc inducido por forskolina ( $373,5 \pm 15,3\%$  del nivel basal;  $n=4$ ) se redujo significativamente

( $p < 0,01$ ) tras la exposición aguda a L-AP4 ( $256,6 \pm 9,9\%$ ;  $n=4$ ) y, tras la preincubación con PTx, dicha respuesta desapareció ( $360,0 \pm 30,1\%$ ;  $n=4$ ;  $p > 0,05$ ; fig. IV. 24 E).



**Figura IV. 24. El tratamiento con L-AP4 incrementa la acumulación de IP<sub>1</sub>.**

Las terminaciones nerviosas de corteza cerebral de rata adulta se incubaron durante media hora con adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína) y en presencia de LiCl 50 mM durante los últimos 20 minutos; tras los cuales, los sinaptosomas fueron lavados mediante centrifugación y resuspensión para, a continuación, realizar el ensayo de determinación de IP<sub>1</sub> o AMPc tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. (A) Curso temporal del efecto del tratamiento con L-AP4 sobre la acumulación de IP<sub>1</sub>. Los sinaptosomas fueron expuestos a L-AP4 1mM durante los tiempos indicados. (B) Curva dosis-respuesta de la acumulación de IP<sub>1</sub> inducida por L-AP4 (pretratamiento de 20 min). (C) Farmacología de la acumulación de IP<sub>1</sub> inducida por L-AP4. Los sinaptosomas se incubaron con L-AP4 1mM durante 20 minutos y después se retiró el agonista mediante lavado por centrifugación y resuspensión. Los distintos fármacos estuvieron presentes durante los tiempos y a las concentraciones indicadas a continuación: CPPG (100μM, 35 min); MPEP (10 μM, 35min); CPCCOEt (1mM, 35min); U-73122 (2 μM, 40min); and U-73343 (2 μM, 40min). Los datos representan el incremento de IP<sub>1</sub> normalizado respecto al nivel basal de los sinaptosomas sin tratar, que fue de  $6,4 \pm 0,05$  pmol. (D) Sensibilidad a toxina pertúsica de la acumulación de IP<sub>1</sub> inducida por L-AP4. Los sinaptosomas fueron incubados en ausencia y presencia PTx (1,5 μg/ml) durante 2 horas y estimulados con L-AP4 1mM los últimos 20 minutos. (E) Sensibilidad a PTx de la reducción por L-AP4 de los niveles de AMPc estimulados con forskolina. Los sinaptosomas fueron incubados en ausencia y en presencia de PTx (1,5μg/ml) durante 2 horas y después estimulados con forskolina 100 μM durante 15 min. y, seguidamente, con L-AP4 1 mM durante otros 5 min. Los resultados se representaron como una normalización del incremento de AMPc respecto al nivel basal en los botones sin tratar ( $19,2 \pm 0,7$  pmol). Los resultados representan la media  $\pm$  error típico de 5 experimentos realizados en 5 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores control correspondientes mediante el test de la *t* de Student: <sup>NS</sup>*p*>0,05; \**p*<0,05 y \*\**p*<0,01.

#### 4.5. mGluR7 induce la translocación a membrana de Munc 13-1.

El hecho de que la facilitación de la liberación mediada por L-AP4 resulte insensible al inhibidor específico de PKC, bisindolilmaleimida, y sin embargo, sea suprimida por calfofina C (fig. IV. 20 D) que, además de a PKC, inhibe a otras proteínas activadas por DAG, como es munc 13-1, apoya la implicación de esta última en la respuesta facilitadora inducida por L-AP4. Además, si tenemos en cuenta que munc 13-1 se localiza en la zona activa, que es una diana de los ésteres de forbol y que juega un papel esencial en el cebado o *priming* de vesículas sinápticas implicado en la potenciación de la liberación de neurotransmisores (Betz y cols., 1998; Rhee y cols., 2002; Bauer y cols., 2007); resulta especialmente interesante el estudio de la posible activación de esta proteína por la estimulación prolongada de mGluR7.

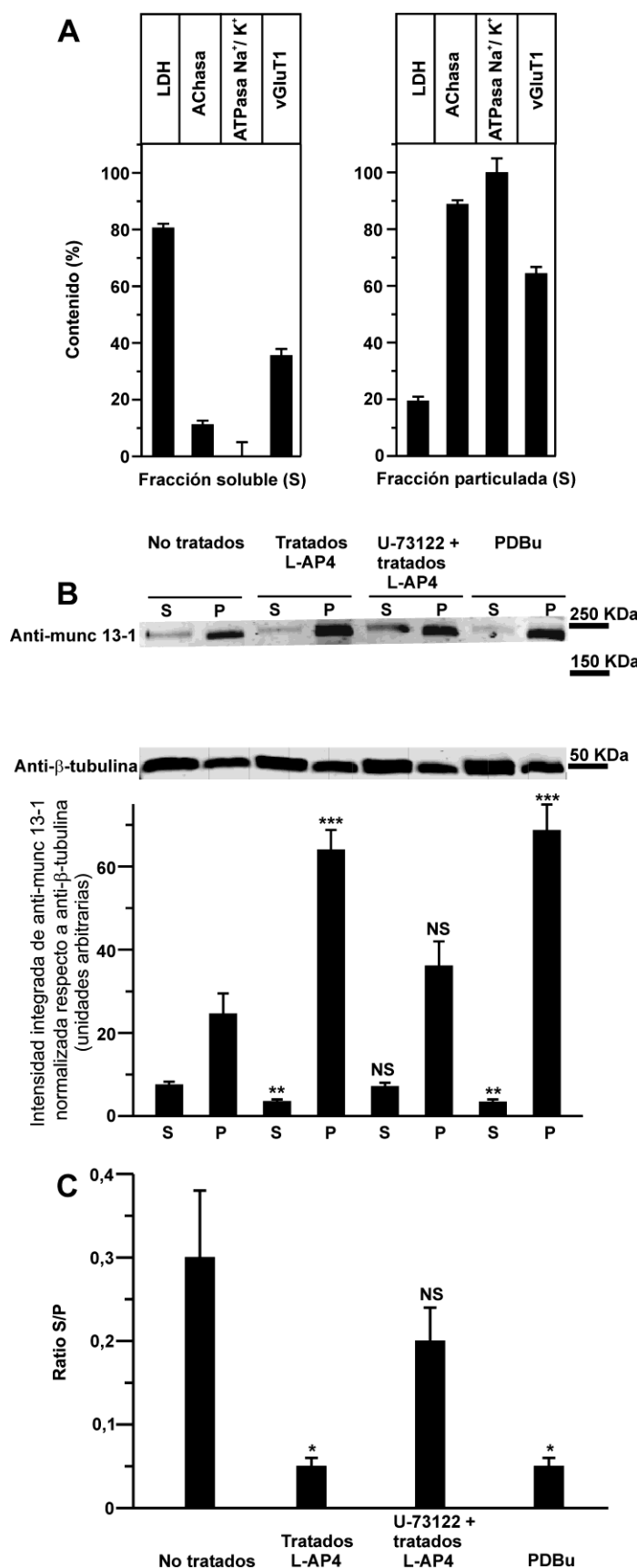
Para poder abordar este estudio, aprovechamos la distribución de munc 13-1 en dos reservorios de diferentes características bioquímicas: uno de ellos soluble y el otro insoluble (Brose y cols., 1995; Betz y cols., 1998; Kalla y cols., 2006). De este modo y, dado que los DAG y los ésteres de forbol incrementan la asociación de munc 13-1 con la membrana plasmática (Brose y Rosenmund, 2002; Ashery y cols., 2000), analizamos si la estimulación prolongada de mGluR7 alteraba la distribución subcelular de munc 13-1 entre las fracciones soluble y particulada procedentes de botones sinápticos.

Primero caracterizamos las fracciones soluble y de membrana obtenidas por centrifugación diferencial (20.000 xg) según su contenido en proteínas. La fracción soluble tiene un alto contenido en lactato deshidrogenasa ( $80,6 \pm 1,5\%$ ;  $n=6$ ; fig. IV. 25 A), un contenido moderado en el marcador vesicular vGluT1 ( $35,6 \pm 2,3\%$ ;  $n=6$ ) y contenidos aún menores en los marcadores de membrana acetilcolinesterasa ( $11,2 \pm 1,4\%$ ;  $n=6$ ) y ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ( $0,1 \pm 5,0\%$ ;  $n=6$ ). Por el contrario, la fracción particulada tiene un bajo contenido en LDH ( $19,4 \pm 1,5\%$ ;  $n=6$ ) y un enriquecimiento en vGluT1 ( $64,4 \pm 2,3\%$ ;  $n=6$ ), acetilcolinesterasa ( $88,8 \pm 1,4\%$ ;  $n=6$ ) y ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ( $99,9 \pm 5,0\%$ ;  $n=6$ ; fig. IV. 25 A).

Una vez caracterizadas ambas fracciones, determinamos mediante inmunotransferencia el contenido en munc 13-1 de las mismas (fig. IV. 25 B) para después cuantificarlo mediante densitometría (fig. IV. 25 B y C). De esta manera, en las terminaciones sinápticas sin tratar, la razón entre el contenido en munc 13-1 de la fracción soluble y el de la fracción particulada (S/P) fue de  $0,30 \pm 0,08$  ( $n=6$ ) y este valor se redujo de manera significativa ( $p<0,01$ ) tras la exposición prolongada a L-AP4 ( $0,05 \pm 0,01$ ;  $n=6$ ), indicando que dicho tratamiento produce una translocación neta de munc 13-1 desde la fracción

soluble a la fracción particulada. De acuerdo tanto con los resultados de liberación, como con los de acumulación de  $IP_1$  (fig. IV. 22 D y 24 C), el efecto del tratamiento con L-AP4 fue revertido con el inhibidor de PLC, U-73122 ( $0,20 \pm 0,04$ ;  $n=6$ ;  $p>0,05$ ) (fig IV. 25 C). Cabe destacar que el análogo estable de DAG, PDBu, también produjo la translocación de munc 13-1 a la fracción particulada (ratio S/P de  $0,05 \pm 0,01$ ;  $p<0,01$ ;  $n=6$ ) (fig IV. 25 C). Por tanto, estos datos confirman que mGluR7 produce una translocación de la proteína munc 13-1 mediada por activación de PLC y producción de DAG.



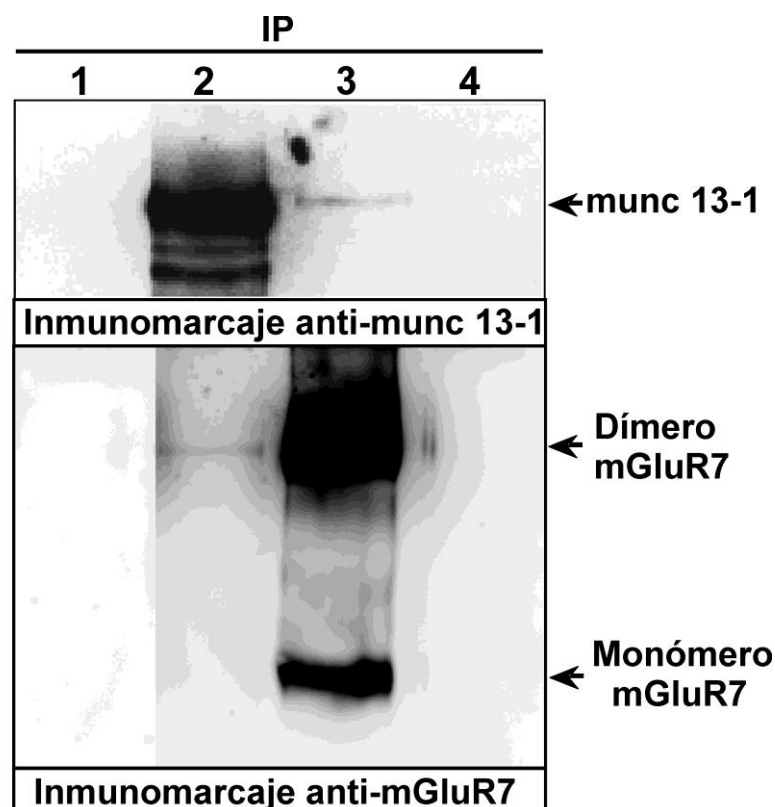


**Figura IV. 25. La estimulación prolongada de mGluR7 produjo la translocación de munc 13-1.**

Los sinaptosomas de corteza cerebral de rata adulta se incubaron durante media hora en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína). Después, las terminaciones nerviosas se centrifugaron (13000 g, 1 min) y el precipitado se resuspendió con una jeringa de calibre 20 (2 mg/ml) en un medio hiposmótico (Tris-HCl 8,3 mM, pH 7.4) dejando la suspensión en hielo durante media hora en agitación continua. A continuación, las muestras se centrifugaron a 20.000 g durante 10 min obteniéndose un sobrenadante (fracción soluble) y un precipitado (fracción particulada), este último fue solubilizado en tampón RIPA. (A) Caracterización basada en el contenido proteico de las fracciones soluble y particulada. Para cada fracción se determinó el contenido relativo en las enzimas acetilcolinesterasa (AChase) y lactato deshidrogenasa (LDH) (mediante fluorimetría) y en vGluT1 y ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (mediante inmunotransferencia) y la suma del contenido proteico de ambas fracciones se tomó como 100%. (B) Contenido en munc 13-1 de las fracciones soluble (S) y particulada (P) tanto de los sinaptosomas no tratados como de los tratados durante 10 minutos con L-AP4 1mM en ausencia y en presencia de U-73122 2μM (30 min,) y de los que fueron estimulados con PDBu 1μM (2 min). Los diagramas de barras muestran la cuantificación (mediante inmunotransferencia) del contenido en munc 13-1 para cada una de las condiciones ya indicadas. Los datos se normalizaron con respecto al contenido en tubulina de cada fracción usado como control de carga. (C) Razón entre las fracciones soluble y particulada calculadas para cada tratamiento. Los datos representan la media  $\pm$  error típico de 4-6 experimentos. La significación estadística se calculó comparando (*t* de Student) el contenido de cada fracción o la ratio S/P con la de los botones sin tratar.

#### 4.6. Coinmunoprecipitación de mGluR7 y Munc 13-1.

Dado que tanto el receptor mGlu7 como la proteína munc 13-1 se localizan en la zona activa presináptica (Shigemoto y cols., 1996; Ashery y cols., 2000) nos planteamos la idea de que ambos formaran parte de un complejo proteico estable. Para confirmar esta hipótesis, realizamos experimentos de coinmunoprecipitación a partir de extractos de sinaptosomas P<sub>2</sub>. De este modo, observamos que el anticuerpo frente al receptor mGlu7 inmunoprecipitó una banda de aproximadamente 200 kDa correspondiente a la proteína Munc 13-1 (fig IV. 26, calle 3 panel superior). Así mismo, la inmunoprecipitación con el anticuerpo contra Munc 13-1 originó una banda de aproximadamente 200kDa correspondiente a la forma dimérica del receptor mGlu7 (fig. IV. 26, calle 2, panel inferior). Como era de esperar, el anticuerpo contra mGluR7 inmunoprecipitó tanto las formas monomérica y dimérica del receptor (fig. IV. 26, calle 3, panel inferior) y el anticuerpo frente a Munc 13-1 inmunoprecipitó a esta proteína (fig IV. 26, calle 2, panel superior). Estos resultados sugieren que, en las terminaciones nerviosas de la corteza cerebral de rata adulta, el receptor mGlu7 y la proteína munc 13-1 forman parte de un mismo complejo que posee interacciones proteína-proteína suficientemente estables como para resistir las condiciones de solubilización y coinmunoprecipitación empleadas. La estabilidad de dichos complejos proteicos podría ser reflejo de su relevancia fisiológica.

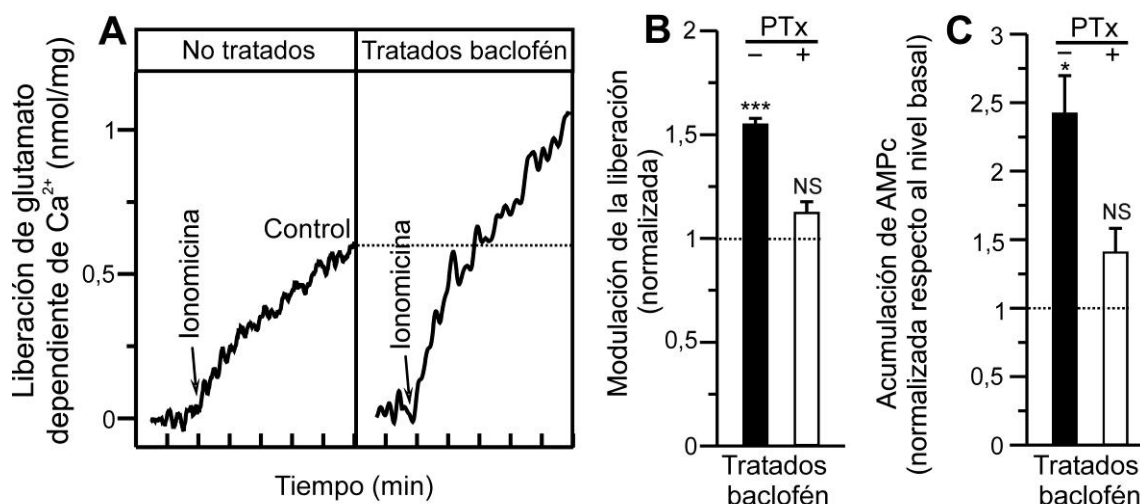


**Figura IV. 26. mGluR7 y munc 13-1 coinmunoprecipitan recíprocamente.**

Los sinaptosomas P<sub>2</sub> de corteza cerebral de rata adulta se homogeneizaron con un homogeneizador VDI 12 y se solubilizaron en tampón RIPA (Tris-HCl 50mM; NaCl 100mM; Triton X-100 al 1%; desoxicolato sódico 0,5%; SDS al 0,2% y EDTA 1 mM; pH 7,4) durante 30 min en hielo. Después se centrifugaron (13.000 g, 30 min) y los sobrenadantes se procesaron para la inmunoprecipitación (4°C y agitación constante) primero se incubaron toda la noche con los anticuerpos monoclonal de ratón frente a munc 13-1 (5µg, calle 2), policlonal purificado de conejo contra mGlu7a (5µg, ), anti-flag de conejo (5µg, calle 1) o anti-flag de ratón (5µg, calle 4) para después incubarlos toda la noche con esferas de agarosa, en los inmunoprecipitados con anticuerpos de ratón, o con esferas TrueBlot en el caso de los inmunoprecipitados con anticuerpos de conejo. Posteriormente, la esferas se lavaron mediante centrifugación (13.000 g) con tampón RIPA (4°C) y el sobrenadante se eliminó mediante aspiración con una jeringa de calibre 28. Las proteínas recuperadas se sometieron a inmunotransferencia en membranas de PVDF y se incubaron con los anticuerpos policlonales de conejo frente a munc 13-1 (1µg/ml, panel superior) y frente a mGluR7 (2,5 µg/ml, panel inferior). Finalmente, las membranas se revelaron con los anticuerpos secundarios de conejo conjugados con peroxidasa de rábano del sistema TrueBlot con el fin de evitar la reactividad cruzada con las IgG de conejo no unidas a las proteínas de interés.

#### **4.7. La estimulación prolongada del receptor GABA<sub>B</sub> también potencia la liberación de glutamato y la acumulación de IP<sub>1</sub>.**

Resultados previos han demostrado que el receptor mGlu7 coexiste con otros receptores presinápticos que también inhiben la liberación de glutamato como son los de adenosina A<sub>1</sub> y GABA<sub>B</sub> (Ladera y cols., 2007). Por ello, nos pareció de especial interés analizar si estos últimos también potencian la liberación de neurotransmisor. Para ello, determinamos la liberación de glutamato inducida con ionomicina en sinaptosomas preincubados durante 10 minutos con el agonista del receptor GABA<sub>B</sub>, baclofén. La exposición prolongada a baclofén también incrementó la liberación de glutamato ( $155,2 \pm 2,7\%$  respecto a los sinaptosomas sin tratar;  $n=7$ ;  $p<0,01$ ; fig. IV. 27 A y B). La estimulación prolongada del receptor GABA<sub>B</sub> también incrementó la acumulación de IP<sub>1</sub> ( $142 \pm 27,2\%$  respecto al nivel basal en los botones sinápticos sin tratar;  $n=4$ ;  $p<0,05$ ; fig. IV. 27 C). Sin embargo, a diferencia de mGluR7, la presencia de toxina pertúsica redujo en su mayor parte tanto la facilitación de la liberación ( $112,7 \pm 4,9\%$ ;  $n=9$ ;  $p>0,05$ ; fig. IV. 27 B) como el incremento en la acumulación de IP<sub>1</sub> ( $41,2 \pm 17,1$ ;  $n=4$ ;  $p>0,05$ ; fig. IV. 27 C) inducidos por baclofén. Por tanto, una proteína G sensible a PTx, como es el caso del subtipo Gi/o, podría estar implicada en estas respuestas mediadas por el receptor GABA<sub>B</sub>.



**Figura IV. 27.** El receptor  $\text{GABA}_B$  también incrementa la liberación de glutamato y la acumulación de  $\text{IP}_1$ .

Los sinaptosomas de corteza cerebral de rata adulta se incubaron media hora en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína) y, en los ensayos de determinación de  $\text{IP}_1$ , en presencia de  $\text{LiCl}$  50 mM durante los últimos 20 minutos. (A) Liberación de glutamato inducida con ionomicina 2  $\mu\text{M}$  en presencia de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  de 1,33 mM, tanto en sinaptosomas sin tratar como tratados durante 10 min con baclofén 20  $\mu\text{M}$ . (B) La liberación inducida con ionomicina 2  $\mu\text{M}$  se determinó en los botones sinápticos tratados con baclofén tanto en presencia como en ausencia de toxina pertúsica (PTx; 1,5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante dos horas. (C) Acumulación de  $\text{IP}_1$  en terminaciones sinápticas tratadas con baclofén (20  $\mu\text{M}$ , 10 min) tanto en presencia como en ausencia de PTx (1,5  $\mu\text{g/ml}$ ; 2 horas). Los resultados representan la media  $\pm$  error típico de 4 experimentos realizados en 4 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores control en ausencia de PTx mediante el test de la  $t$  de Student:  $^{\text{NS}}p>0,05$ ;  $^*p<0,05$  y  $^{**}p<0,01$ .

#### 4.8. La coadición de los agonistas CHA, baclofén y L-AP4 facilita la liberación de glutamato a concentraciones que no tienen efecto aplicadas por separado.

Dado que el receptor  $\text{GABA}_B$ , igual que  $\text{mGluR7}$ , facilita la liberación, nos planteamos si estos receptores presinápticos, junto con el receptor de adenosina  $\text{A}_1$ , cooperan en la respuesta facilitadora igual que lo hacen en la respuesta inhibitoria.

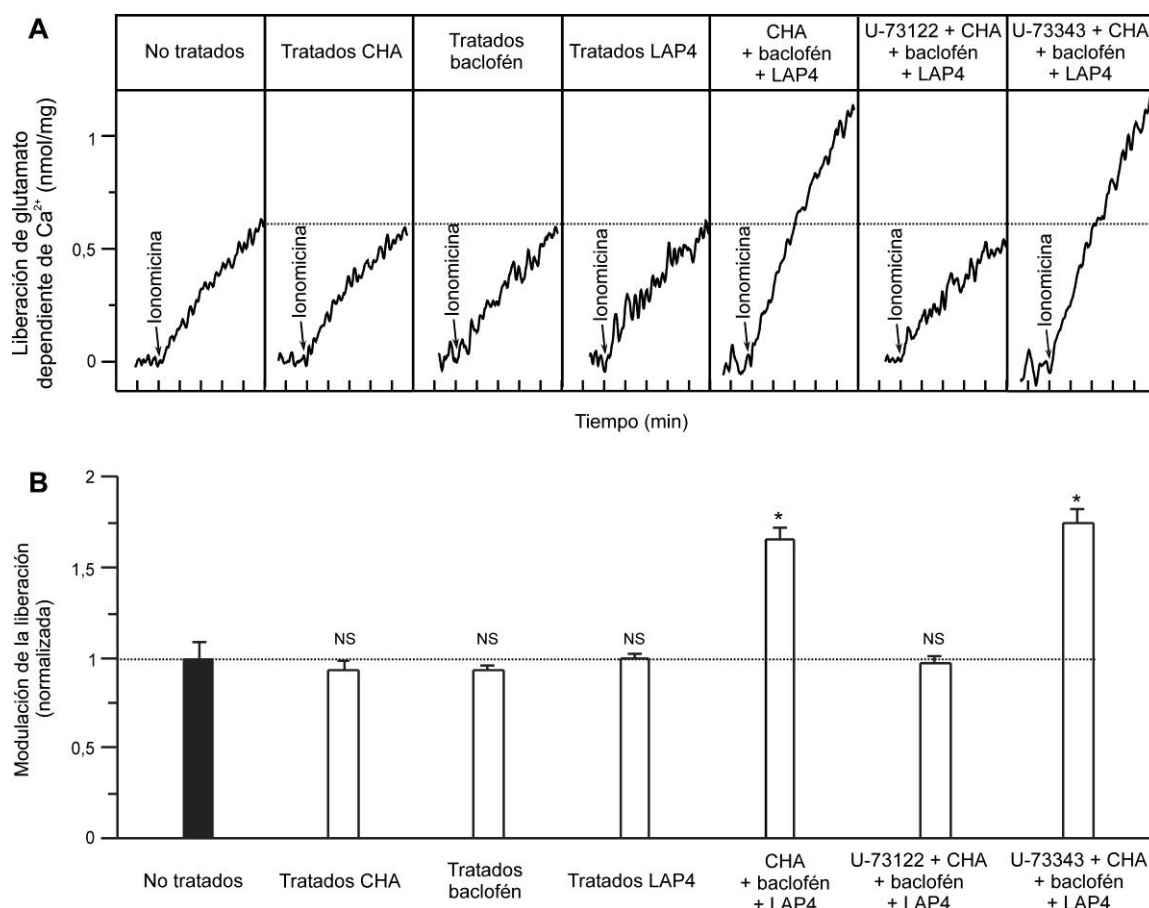
Utilizamos concentraciones subumbrales de agonistas de estos receptores, que hemos establecido como aquella concentración más alta de agonista que, añadida individualmente, no inhibe la liberación.

La preincubación durante 30 minutos con concentraciones subumbrales de los agonistas CHA (10 nM), baclofén (200 nM) o L-AP4 (50  $\mu\text{M}$ ) no afectó en modo alguno la liberación de glutamato inducida con ionomicina ( $93,6 \pm 5,4\%$  respecto a los sinaptosomas sin tratar;  $n=4$ ;  $p>0,05$ ;  $92,9 \pm 2,5\%$ ;  $n=4$ ;  $p>0,05$  y  $100,1 \pm 3,0\%$ ;  $n=4$ ;  $p>0,05$ ; respectivamente; fig. IV. 28 A y B). Sin

embargo, el pretratamiento conjunto con los tres agonistas incrementó la liberación ( $165,4 \pm 7,1\%$ ;  $n=10$ ;  $p<0,05$ ).

Parece por tanto que, al igual que ocurre con la inhibición de la liberación, las respuestas de estos tres receptores se integran en una vía de señalización común que tiene como resultado la potenciación de la liberación de glutamato. No obstante, este sinergismo entre las acciones de los receptores coactivados de modo submáximo requirió tiempos de exposición más largos (30 min) que la activación máxima del receptor mGlu7 o GABA<sub>B</sub> (10 min). Pues 10 minutos de pretratamiento con concentraciones subumbriles de los tres agonistas no produjo efecto alguno ( $97,1 \pm 3,3\%$ ;  $n=4$ ;  $p>0,05$ ; datos no mostrados).

Si como parece, las respuestas de los tres receptores se integran en una vía de señalización común para potenciar la liberación de glutamato, cabría esperar que la potenciación de la liberación observada con los tres agonistas a concentraciones subumbriles comparta el perfil farmacológico con la potenciación observada con concentraciones máximas de L-AP4. Efectivamente, dicha facilitación fue suprimida en presencia del inhibidor activo de PLC, U-73122 ( $96,4 \pm 5,5\%$ ;  $n=5$ ;  $p>0,05$ ) mientras que permaneció inalterada en presencia del análogo inactivo del inhibidor, U-73343 ( $75,4 \pm 6,6\%$ ;  $n=5$ ;  $p<0,05$ ; fig. IV. 28 A y B).



**Figura IV. 28.** La coadición de los agonistas CHA, baclofén y L-AP4 a concentraciones que no tienen efecto cuando se aplican por separado potenció la liberación de glutamato inducida con iononimicina.

Los sinaptosomas de corteza cerebral de rata adulta se incubaron media hora en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína). (A) Liberación de glutamato inducida con iononimicina 2  $\mu$ M en presencia de  $[Ca^{2+}]_{ext}$  de 1,33 mM tanto en sinaptosomas sin tratar como tratados durante 30 min con CHA 10 nM o con baclofén 200 nM, o con L-AP4 50  $\mu$ M o bien con los tres agonistas a la vez. Además, los sinaptosomas tratados con los tres agonistas simultáneamente también se incubaron en presencia del inhibidor de PLC, U-73122 2  $\mu$ M así como de su análogo inactivo, U-73343 2  $\mu$ M. (B) Los datos del efecto de cada tratamiento se representaron como una normalización respecto al control, que fue la liberación de glutamato inducida por iononimicina (2  $\mu$ M) en sinaptosomas no tratados. Los resultados representan la media  $\pm$  error típico de 4-5 experimentos realizados en 4-5 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores control en ausencia de tratamiento mediante el test de la *t* de Student: <sup>NS</sup> $p > 0,05$ ; \* $p < 0,05$ .

## 5. Oclusión de la facilitación por mGluR7 por los ésteres de forbol.

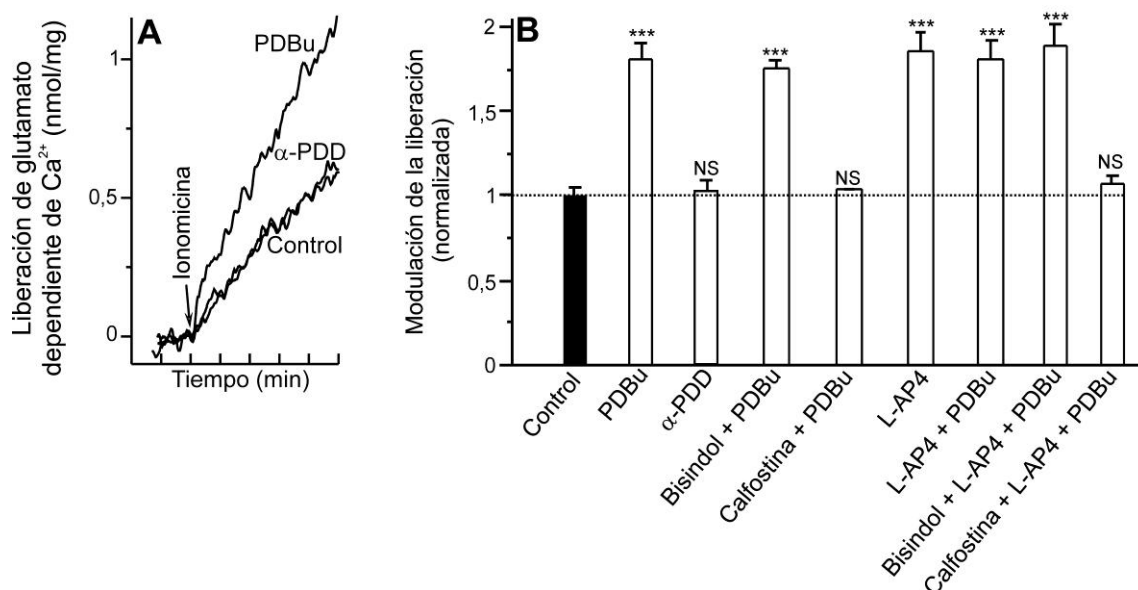
Como ya hemos mostrado, mGluR7 potencia la liberación de glutamato mediante una vía de señalización que implica la activación de PLC, la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>) y la translocación a membrana de la proteína munc 13 por un mecanismo dependiente del incremento en los niveles de DAG. Puesto que los ésteres de forbol potencian la transmisión sináptica por mecanismos PKC-dependientes (Herrero y cols., 1992; Parffit y Madison, 1993; Stea y cols., 1995; Zhang y cols., 2001; Stevens y Sullivan, 1998; Wu y Wu, 2001; Rhee y cols., 2001; Wierda y cols., 2007) y PKC-independientes, debido a la activación de las proteínas Munc 13 (Betz y cols., 1998; Rhee y cols., 2002), nos planteamos si ambas vías de señalización, tanto la iniciada por mGluR7 como por los ésteres de forbol, convergen en su mecanismo de acción y si, por tanto, se ocluyen la una a la otra.

### 5. 1. La potenciación de la liberación mediada por ésteres de forbol y L-AP4 se ocluyen.

Primero caracterizamos la potenciación de la liberación inducida por los ésteres de forbol en la preparación de sinaptosomas corticales. Para ello, analizamos la liberación de glutamato inducida con el ionóforo ionomicina que, como ya hemos visto, provoca una liberación de neurotransmisor independiente de la actividad de los canales de calcio y dependiente de la respuesta de la maquinaria exocitótica al calcio. En estas condiciones, la liberación inducida por ionomicina ( $0,59 \pm 0,04$  nmol glu/mg proteína  $\pm$  error típico;  $n=12$ ) se incrementó por el éster de forbol, PDBu, hasta un  $181,0 \pm 9,1\%$  respecto al control ( $n=12$ ;  $p<0,001$ ) mientras que el éster de forbol inactivo,  $\alpha$ -PDD, no tuvo efecto alguno ( $101,6 \pm 6,8\%$ ;  $n=6$ ;  $p>0,05$ ) (fig. IV 29 A y B). La potenciación mediada por PDBu resultó insensible al inhibidor específico de PKC, bisindolilmaleimida, que impide la unión del ATP ( $175,5 \pm 5,5\%$ ;  $n=10$ ;  $p<0,001$ ) pero fue suprimida por calfofina C ( $102,9 \pm 1,3\%$ ;  $n=8$ ;  $p>0,05$ ). Teniendo en cuenta que calfofina C actúa a nivel del sitio de unión de DAG y que, por tanto, inhibe no sólo a PKC sino también a otras proteínas no quinasas con capacidad de unir DAG tales como munc 13-1 (Brose y Rosenmund, 2002), parece razonable afirmar que dicha proteína también estaría implicada en la potenciación de la liberación mediada por PDBu. Por consiguiente, dado que



tanto PDBu como L-AP4 inducen una potenciación de la liberación que es sensible a calfofina C, analizamos los efectos de la adición de ambos compuestos. En dichos experimento, añadimos primero PDBu para evitar la desensibilización de mGluR7 que provocan los ésteres de forbol (Herrero y cols., 1994; Macek y cols., 1998). La potenciación de la liberación inducida tras la coadición de L-AP4 y PDBu ( $181,4 \pm 10,4\%$  respecto al control sin tratar;  $n=8$ ;  $p<0,001$ ) fue similar a la obtenida con L-AP4 ( $186,0 \pm 10,7\%$ ;  $n=8$ ;  $p<0,001$ ) o PDBu ( $181,0 \pm 9,1\%$ ;  $n=12$ ;  $p<0,001$ ) por separado. La potenciación de la liberación inducida tras la coadición de L-AP4 y PDBu también fue insensible a bisindolilmaleimida ( $189,3 \pm 11,7\%$ ;  $n=8$ ;  $p<0,001$ ) y bloqueada por calfofina C ( $106,8 \pm 4,1\%$ ;  $n=8$ ;  $p>0,05$ ). Todos estos datos sugieren que los ésteres de forbol y la activación de mGluR7 utilizan una vía de señalización común para potenciar la liberación. Sin embargo, el hecho de que la magnitud de las potenciación mediada por PDBu fuera similar a la inducida por L-AP4, a pesar de la amplia distribución de munc 13-1 (Augustin y cols., 1999), en comparación con la expresión más restringida de mGluR7 en las terminaciones sinápticas de la corteza cerebral (Millán y cols., 2002a y 2003) (fig. IV. 11 y 20), fue algo inesperado.



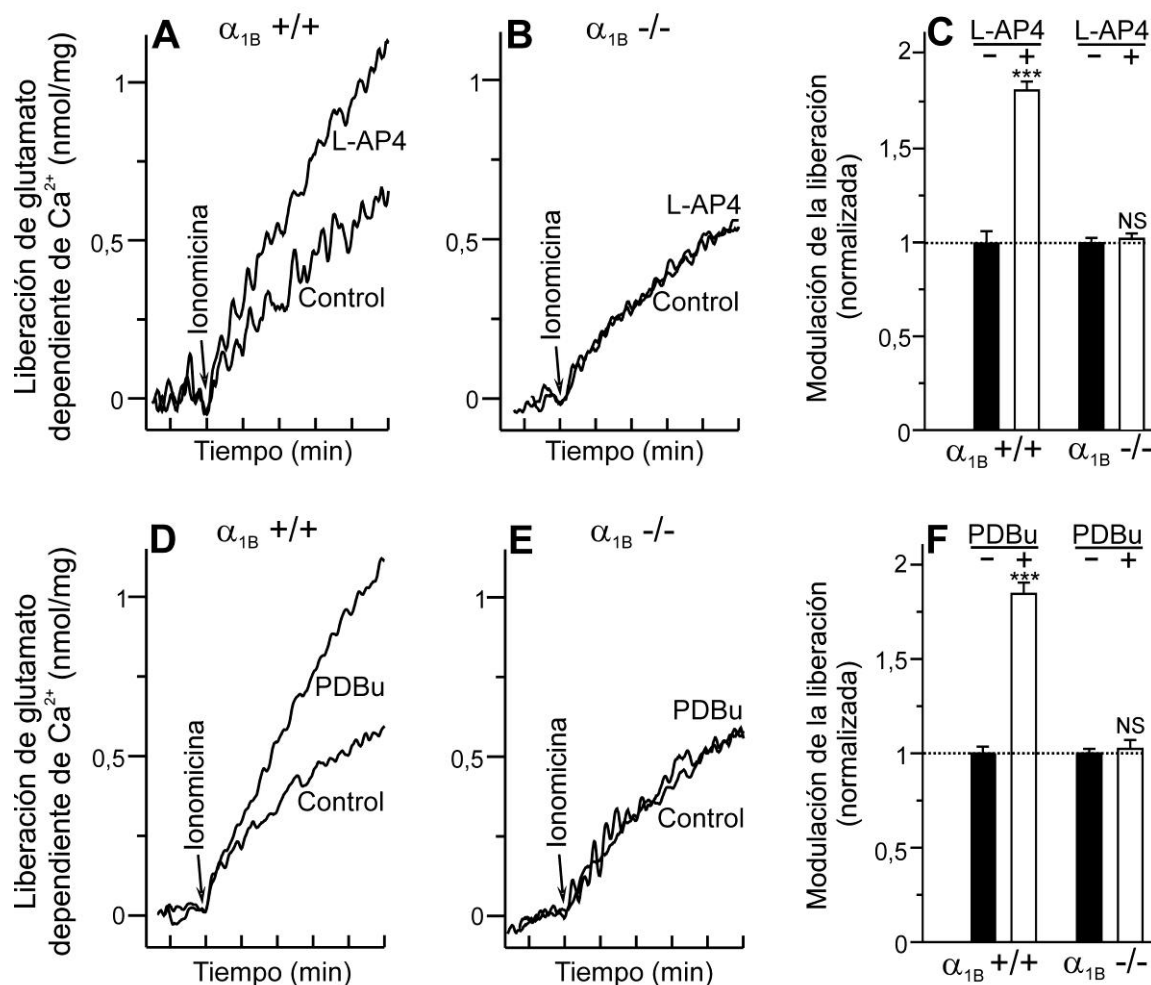
**Figura IV. 29. La potenciación de la liberación mediada por los ésteres de forbol y L-AP4 se ocuyen.**

Los sinaptosomas de corteza cerebral se incubaron media hora en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína) y en presencia del éster de forbol activo  $4\beta$ -PDBu  $1\mu\text{M}$  o del forbol inactivo  $4\alpha$ -PDD  $1\mu\text{M}$  durante los 2 últimos minutos así como en presencia de L-AP4  $1\text{mM}$  los últimos 10 minutos. A continuación, los sinaptosomas fueron lavados mediante centrifugación y resuspensión en HBM ( $0,67\text{ mg/ml}$ ) y se determinó la liberación de glutamato inducida por ionomicina  $2\mu\text{M}$  en presencia de una  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  de  $1,33\text{ mM}$ . Los sinaptosomas control se trataron de igual modo pero en ausencia de las drogas. (A) Efecto del tratamiento de los ésteres de forbol sobre la liberación de glutamato inducida por ionomicina. (B) El diagrama de barras muestra la farmacología de la potenciación de la liberación mediada por PDBu. Dicha potenciación se determinó en presencia de bisindolilmaleimida  $1\mu\text{M}$  o de calfofistina C  $0,1\mu\text{M}$  añadidas media hora antes del ensayo de liberación. En aquellos experimentos en los que los sinaptosomas se trataron conjuntamente con L-AP4 y PDBu, L-AP4 ( $1\text{mM}$ ), 10 min) se añadió antes que PDBu ( $1\mu\text{M}$ , 2min). Los datos del efecto de cada tratamiento se representaron como una normalización respecto al control, que fue la liberación de glutamato inducida por ionomicina ( $2\mu\text{M}$ ) en sinaptosomas no tratados. Los resultados representan la media  $\pm$  error típico de 8-12 experimentos realizados en 8-12 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores control en ausencia de tratamiento mediante el test de la  $t$  de Student:  $^{\text{NS}}p>0,05$ ;  $^{\text{***}}p<0,001$ .

## 5. 2. Pérdida de la potenciación de la liberación por L-AP4 y por ésteres de forbol en botones sinápticos carentes del canal de calcio de tipo N.

En la preparación de sinaptosomas de corteza cerebral, el receptor mGlu7 se expresa preferentemente en botones sinápticos con canales de calcio de tipo N (Millán y cols., 2002a). Además, la respuesta inhibitoria de mGluR7 se pierde en los ratones que carecen del canal de calcio de tipo N (ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$ ) no experimentan la inhibición de la liberación mediada por mGluR7 a pesar de que el receptor se expresa con normalidad (fig. IV. 11). Por tanto, parece interesante conocer si la potenciación de la liberación inducida por L-AP4 también está asociada a la expresión de canales de calcio de tipo N. Para ello, determinamos la potenciación de la liberación inducida por L-AP4 tanto en sinaptosomas de ratones control ( $\alpha_{1B}^{+/+}$ ), en los que el tratamiento con L-AP4 provocó un incremento de la liberación de glutamato inducida con ionomicina de  $180,7 \pm 4,1\%$  respecto a los sinaptosomas sin tratar ( $n=8$ ,  $p<0,001$ ), así como en sinaptosomas de animales ( $\alpha_{1B}^{-/-}$ ), donde el mismo tratamiento no produjo incremento alguno en la liberación de glutamato ( $101,3 \pm 3,0$ ;  $n=8$ ;  $p>0,05$ ) (fig. IV. 30 A, B y C). Esta pérdida de la respuesta facilitadora de mGluR7 en los ratones que carecen de canal de calcio de tipo N, sugiere que la expresión del canal es esencial no sólo para el acoplamiento del receptor a la vía de señalización inhibitoria (fig IV. 10) sino también para su acoplamiento a la vía de señalización que conduce al incremento de la liberación de glutamato.

A continuación, determinamos la potenciación de la liberación mediada por ésteres de forbol en los ratones carentes del canal de calcio de tipo N. En los animales control el tratamiento con PDBu incrementó significativamente la liberación de glutamato ( $183,7 \pm 6,8\%$  respecto a los botones sin tratar;  $n=7$ ;  $p<0,01$ ), mientras que, en los ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$ , el mismo tratamiento no tuvo efecto alguno sobre la liberación ( $102,6 \pm 3,6\%$ ;  $n=9$ ;  $p>0,05$ ) (fig. 30 D, E y F). Teniendo en cuenta la amplia expresión de proteína munc 13-1 susceptible de activación por PDBu en la corteza cerebral (Augustin y cols., 1999), la pérdida de la potenciación de la liberación mediada por ésteres de forbol fue algo inesperado.

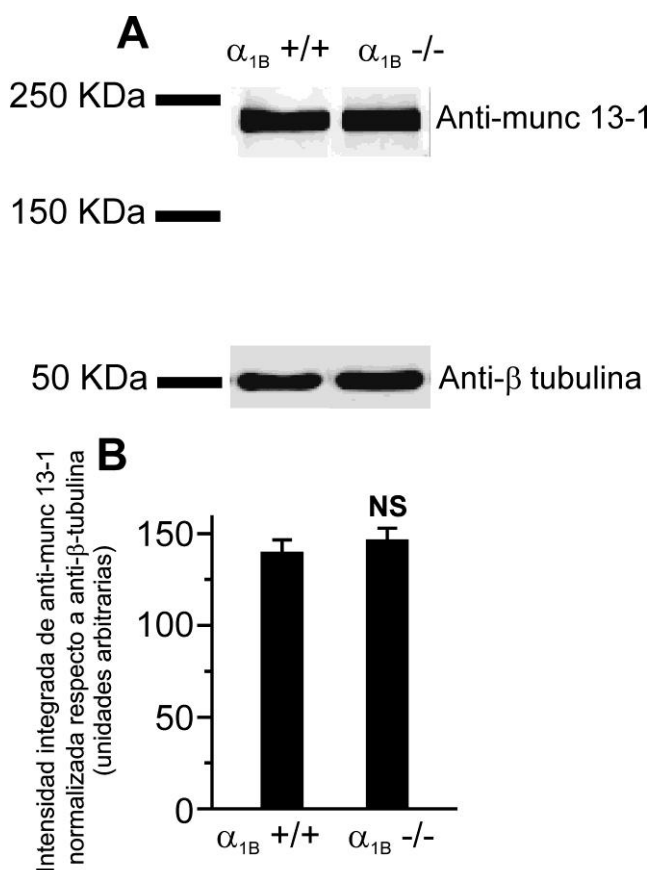


**Figura IV. 30. Pérdida de la potenciación de la liberación inducida por L-AP4 y por ésteres de forbol en las terminaciones sinápticas de los ratones carentes del canal de calcio de tipo N.**

Los sinaptosomas de corteza cerebral tanto de ratones  $\alpha_{1B} (+/+)$  como  $\alpha_{1B} (-/-)$  se incubaron media hora en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína así como en presencia o en ausencia (control) de L-AP4 1mM (A y B) o PDBu 1μM (D y E) durante los últimos 10 y 2 minutos, respectivamente. A continuación, los sinaptosomas se lavaron mediante centrifugación y resuspensión y se determinó la liberación de glutamato inducida por ionomicina 2μM. Los diagramas de barras C y F representan el efecto del tratamiento con L-AP4 o PDBu (barra sin relleno) tanto en sinaptosomas de ratones  $\alpha_{1B} (+/+)$  como  $\alpha_{1B} (-/-)$  normalizado respecto al control (barra con relleno), que fue la liberación de glutamato inducida por ionomicina (2μM) en sinaptosomas no tratados. Los resultados representan la media  $\pm$  error típico de 8-12 experimentos realizados en 8-12 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores control en ausencia de tratamiento mediante el test de la *t* de Student: <sup>NS</sup>*p*>0,05; \*\*\**p*<0,001.

### 5.3. Los ratones que carecen de canales N tienen una expresión normal de Munc 13-1 y de Munc 13-2.

Con el objetivo de entender si la causa de la pérdida de la potenciación de la liberación inducida por ésteres de forbol en los ratones carentes de canal de calcio de tipo N radica en la ausencia de proteína Munc 13-1, que parece mediar esta potenciación, determinamos mediante inmunotransferencia el nivel de expresión de dicha proteína tanto en los botones sinápticos de ratones  $\alpha_{1B} +/+$  como de sus compañeros de camada  $\alpha_{1B} -/-$ . Los datos muestran que no existe diferencia alguna entre ambos genotipos ( $140,0 \pm 6,5$  unidades arbitrarias de intensidad integrada,  $n=5$  en animales  $\alpha_{1B} +/+$  y  $146,7 \pm 6,2$ ;  $n=5$ ;  $p>0,05$ ; en ratones  $\alpha_{1B} +/+$  y  $\alpha_{1B} -/-$ , respectivamente) (fig. IV 31).

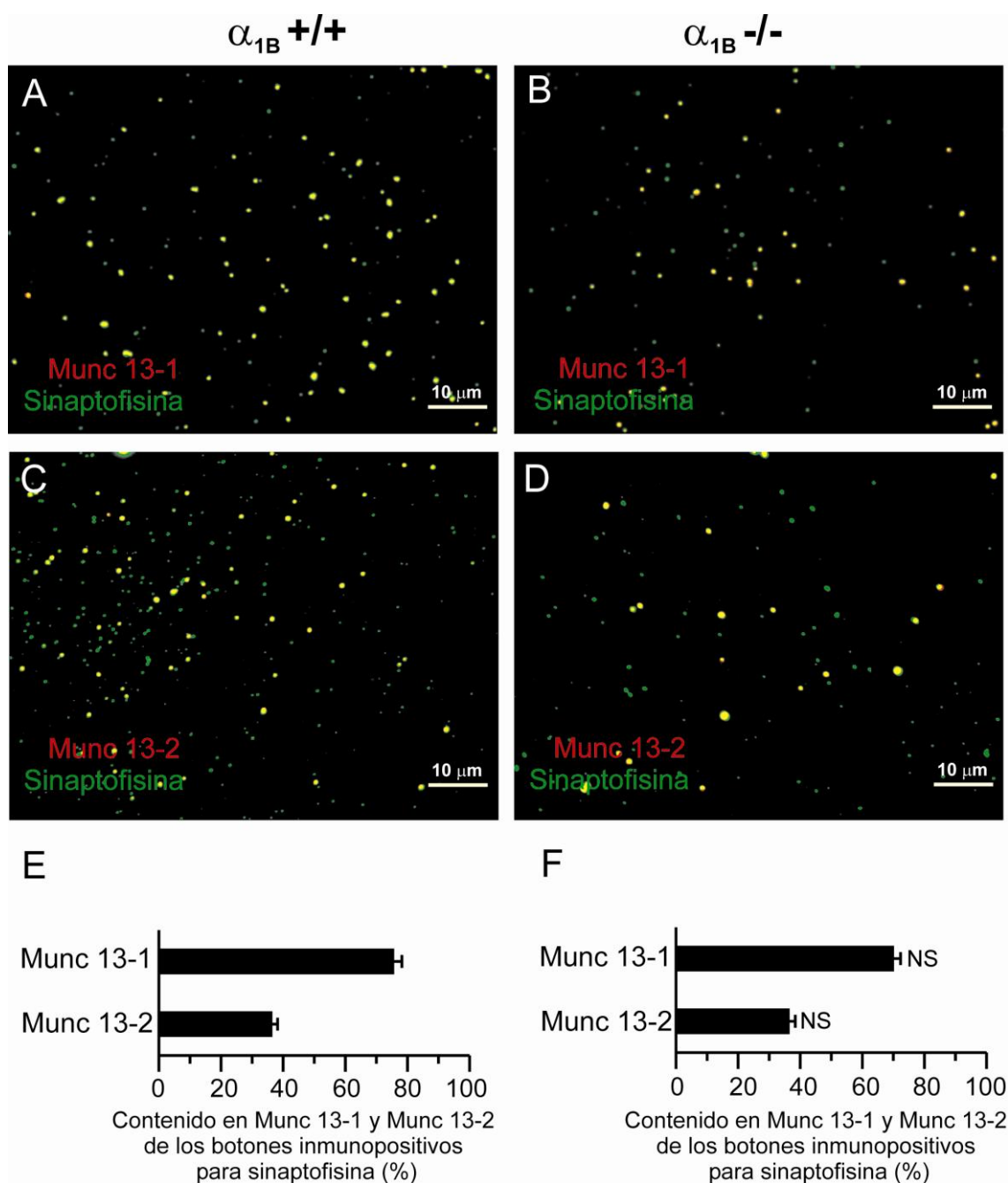


**Figura IV. 31. Los ratones  $\alpha_{1B} -/-$  presentaron niveles de inmunotransferencia de munc 13-1 similares a los animales  $\alpha_{1B} +/+$ .**

Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratones  $\alpha_{1B} +/+$  y  $\alpha_{1B} -/-$  se solubilizaron (2 mg/ml) en tampón RIPA (Tris-HCl 50mM; NaCl 100mM; Triton X-100 al 1%; desoxicolato sódico 0,5%; SDS al 0,2% y EDTA 1 mM; pH 7,4). 3  $\mu$ g de extracto de los extractos obtenidos fueron resueltos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS; 7,5% poliacrilamida) y determinados mediante inmunotransferencia con anticuerpos monoclonales de conejo frente a munc 13-1 (1:200) y de ratón frente a  $\beta$ -tubulina (1:2000). Para la cuantificación se usaron los anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo y anti-ratón acoplados a las sondas infrarrojas IRD 800 y IRD 680, respectivamente, visualizados mediante el sistema de detección Odyssey. Los diagramas de barras muestran la cuantificación del contenido en munc 13-1 normalizado con respecto al contenido en tubulina, que se usó como control de carga en cada calle. Los datos representan la media  $\pm$  error típico

Analizamos también la expresión de munc 13-1 en los botones sinápticos de la corteza cerebral de los ratones  $\alpha_{1B} +/+$  y  $\alpha_{1B} -/-$  mediante experimentos de inmunocitoquímica con anticuerpos dirigidos tanto frente a munc 13-1 como a la proteína vesicular, sinaptofisina, usada como marcador presináptico de referencia. En este caso, tampoco encontramos diferencias significativas entre ambos genotipos. Munc 13-1 se encontró en el  $75,6 \pm 2,6$  % de los botones inmunopositivos a sinaptofisina (3717 sinaptosomas de 25 campos analizados) en los ratones control y en el  $70,1 \pm 2,2$  % de los botones inmunopositivos a sinaptofisina (2836 de 27 campos analizados) en los ratones  $\alpha_{1B} -/-$  (fig. IV. 32 A, B, E y F) ( $p > 0,05$ ). Por tanto, la expresión de la proteína munc 13-1 parece no estar alterada por la pérdida del canal de calcio de tipo N.

En el cerebro se expresan, además de Munc 13-1, aunque de forma más restringida, otras isoformas de esta proteína que también son susceptibles a la activación por ésteres de forbol como son Munc 13-2 y Munc 13-3 (Augustin y cols., 1999). Puesto que munc 13-3 no se expresa en la corteza cerebral, nos limitamos al estudio de la expresión de Munc 13-2. El análisis inmunocitoquímico de la expresión de munc 13-2 en las terminaciones sinápticas de corteza cerebral, no mostró diferencia alguna entre los ratones  $\alpha_{1B} +/+$  y  $\alpha_{1B} -/-$  ( $36,4 \pm 1,8$  % y  $36,5 \pm 1,9$  % en animales  $\alpha_{1B} +/+$  y  $\alpha_{1B} -/-$  , respectivamente,  $p > 0,05$ ) respecto al total de los sinaptosomas marcados con sinaptofisina (5777 de 63 campos procesados y 5432 de 55 campos de ratones  $\alpha_{1B} +/+$  y  $\alpha_{1B} -/-$  , respectivamente) (fig. IV. 32 C, D, E y F).



**Figura IV. 32. La expresión de Munc 13-1 y Munc 13-2 no se altera en los ratones carentes de canales N.**

Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratones adultos se incubaron (2 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) a 37°C durante 1 hora; para después ser fijados sobre cubreobjetos previamente tratados con polilisina y teñidos con anticuerpos de ratón frente a munc 13-1 (1:500) o de cabra contra munc 13-2 (1:150) así como con anticuerpos de conejo frente al marcador vesicular sinaptofisina (1:75). La localización de los anticuerpos se visualizó con los fluorocromos Alexa 488 para sinaptofisina y Alexa 594 en el caso de munc 13-1 y munc 13-2 en botones sinápticos tanto de ratones  $\alpha_{1B}^{+/+}$  (A y C) como  $\alpha_{1B}^{-/-}$  (B y D). Los histogramas muestran el contenido relativo (%) en las proteína munc 13-1 y munc 13-2 de los botones sinápticos inmunopositivos para sinaptofisina tanto en ratones  $\alpha_{1B}^{+/+}$  (E) como  $\alpha_{1B}^{-/-}$  (F). Para cada doble experimento inmunocitoquímico se analizaron 27-63 campos obtenidos de 3 preparaciones de terminaciones nerviosas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores correspondientes en sinaptosomas de ratones  $\alpha_{1B}^{+/+}$  mediante el test de la *t* de Student: <sup>NS</sup> $p > 0,05$ .

#### 5.4. La pérdida del canal de calcio de tipo N no altera la coexpresión de mGluR7 con Munc 13-1 ó Munc 13-2.

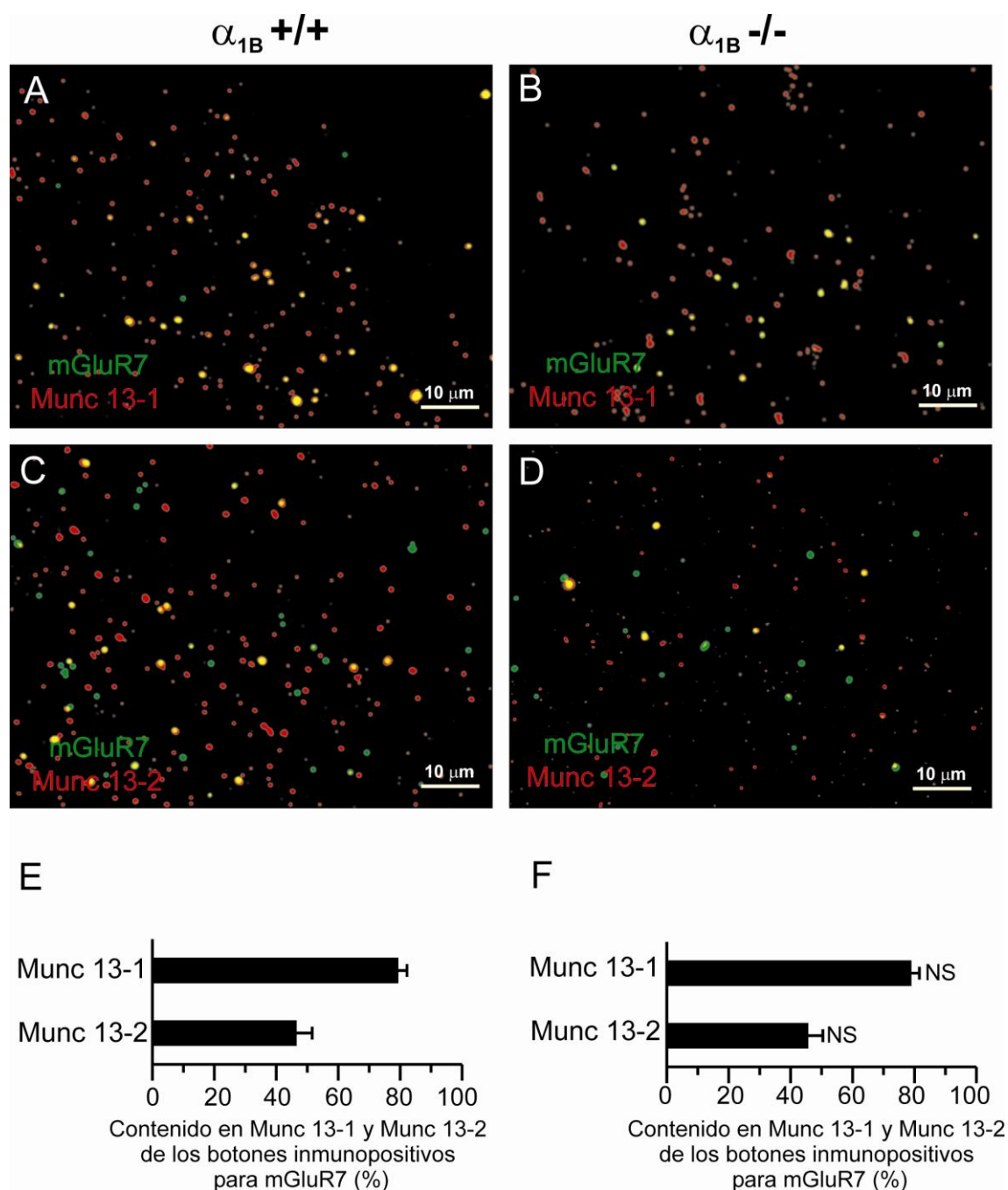
Estudios previos de imagen de calcio en botones sinápticos individuales han mostrado que los canales de calcio de tipo N y P/Q están segregados en dos subpoblaciones distintas en la corteza cerebral de la rata adulta (Millán y cols., 2003). La subpoblación mayor corresponde a botones que expresan canales P/Q y la subpoblación más pequeña a botones con canales N (Millán y cols., 2002a). Los experimentos de imagen de calcio junto con los de liberación de glutamato e inmunocitoquímica, han mostrado que, en la corteza cerebral, mGluR7 se expresa casi exclusivamente en aquellas terminaciones sinápticas que contienen canales de calcio de tipo N (Millán y cols., 2003).

Atendiendo a estos precedentes, nuestra observación de que tanto la potenciación de la liberación de glutamato mediada por mGluR7 como por los ésteres de forbol desaparecen cuando se eliminan los canales de calcio de tipo N sugiere que ambas respuestas se restringen a terminaciones nerviosas con este tipo de canales de calcio. Si, además, tenemos en cuenta el hecho de que ambas respuestas requieren la activación de la proteína Munc 13-1 y que poseen una magnitud similar, a pesar de la amplia expresión de Munc 13-1 (Augustin y cols., 1999) y la expresión restringida de mGluR7 en la corteza cerebral (Millán y cols., 2002), parece interesante analizar si la pérdida de los canales de tipo N conlleva alguna alteración en la expresión de mGluR7 y de las proteínas Munc 13. Lo que explicaría la desaparición de la respuesta facilitadora de mGluR7 en los ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$ . El análisis mediante inmunocitoquímica de la expresión de mGluR7 y munc 13-1 en los botones sinápticos de animales  $\alpha_{1B}^{+/+}$  y  $\alpha_{1B}^{-/-}$  no mostró diferencias. Al contrario, en ambos genotipos encontramos una amplia coexpresión de mGluR7 y de la proteína Munc 13-1. Así, del total de botones sinápticos que expresaron el receptor (4221 sinaptosomas de 51 campos analizados en ratones  $\alpha_{1B}^{+/+}$  y 3622 de 52 campos analizados en ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$ ) el  $79,3 \pm 2,9 \%$  y el  $78,9 \pm 2,7 \%$  (en los animales  $\alpha_{1B}^{+/+}$  y  $\alpha_{1B}^{-/-}$ , respectivamente;  $p > 0,05$ ) expresó también Munc 13-1 (fig. IV. 33 A, B, E y F). Por tanto, la pérdida de la potenciación inducida por L-AP4 y PDBu no se debe a una alteración en la coexpresión de mGluR7 y la proteína Munc 13-1. A continuación, analizamos el contenido de Munc 13-2. Los datos no mostraron diferencia alguna entre ratones  $\alpha_{1B}^{+/+}$  y  $\alpha_{1B}^{-/-}$ ; ya que del total de terminaciones nerviosas que contenían el receptor (816 sinaptosomas de 28 campos analizados y 1032 de 35 campos en animales  $\alpha_{1B}^{+/+}$  y  $\alpha_{1B}^{-/-}$ ,



respectivamente) el  $46,5 \pm 5,1$  % y el  $45,6 \pm 4,8$  % (en los animales  $\alpha_{1B} +/+$  y  $\alpha_{1B} -/-$ , respectivamente;  $p > 0,05$ ) expresaron a su vez la proteína Munc 13-2 (fig. IV. 33 C, D, E y F).

Por tanto, la pérdida de la respuesta facilitadora del receptor asociada a la pérdida del canal de calcio de tipo N no se debe a una expresión alterada de las proteínas Munc 13.



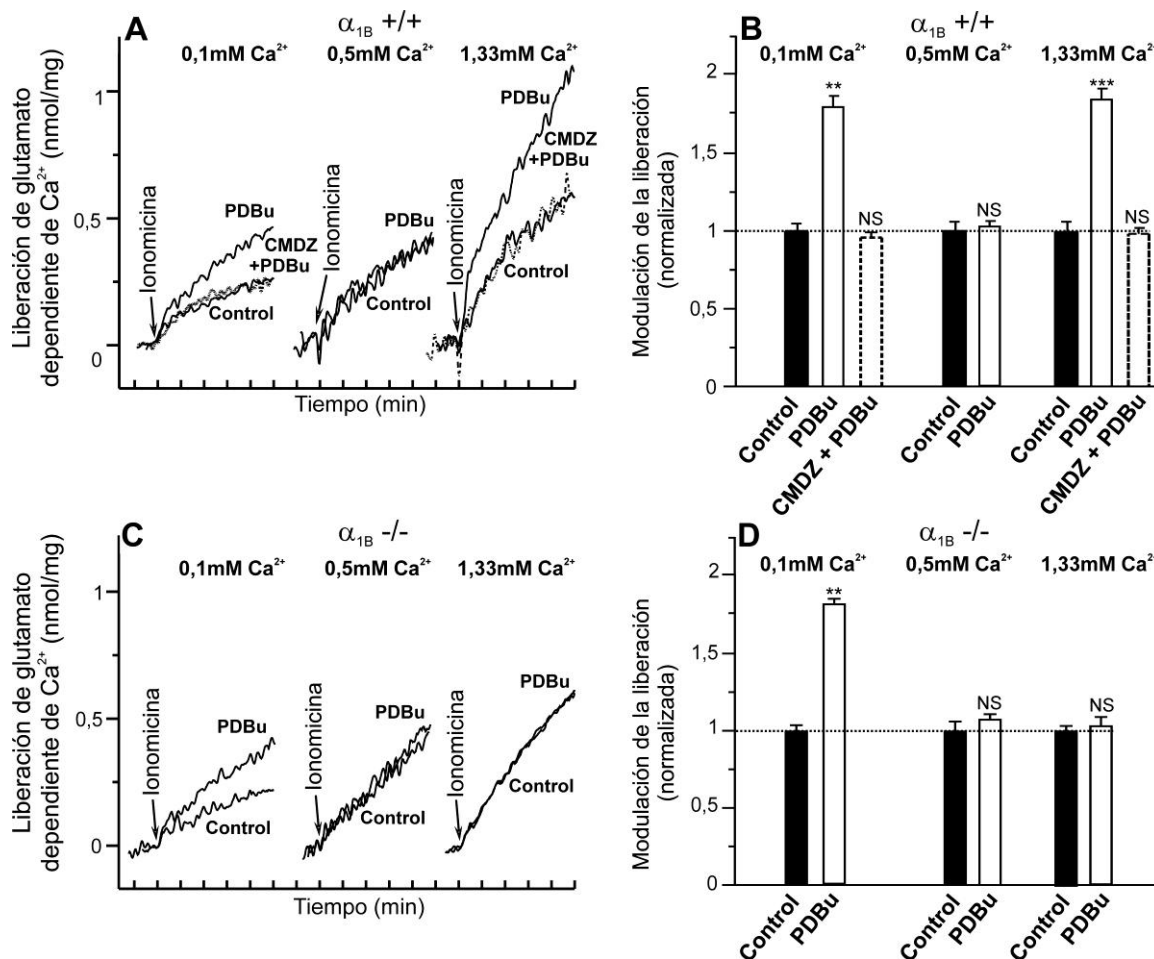
**Figura IV. 33. La pérdida del canal de calcio de tipo N no alteró la coexpresión de mGluR7 con munc 13-1 ni con munc 13-2 en las terminaciones sinápticas de corteza cerebral.**

Los sinaptosomas de corteza cerebral de ratones adultos se incubaron (2 mg/ml) en medio HBM con BSA (1 mg/ml) a 37°C durante 1 hora; para después ser fijados sobre cubreobjetos previamente tratados con polilisina y teñidos con anticuerpos de ratón frente a munc 13-1 (1:500) o de cabra contra munc 13-2 (1:150) así como con anticuerpos de conejo frente al receptor mGlu7 (1:400). La localización de los anticuerpos se visualizó con los fluorocromos Alexa 488 para mGlu7 y Alexa 594 en el caso de munc 13-1 y munc 13-2 en botones sinápticos tanto de ratones  $\alpha_{1B} +/+$  (A y C) como  $\alpha_{1B} -/-$  (B y D). Los histogramas muestran el contenido relativo (%) en las proteína munc 13-1 y munc 13-2 de los botones sinápticos inmunopositivos para mGlu7 tanto en ratones  $\alpha_{1B} +/+$  (E) como  $\alpha_{1B} -/-$  (F). Para cada doble experimento inmunocitoquímico se analizaron 28-52 campos obtenidos de 3 preparaciones de terminaciones nerviosas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores correspondientes en sinaptosomas de ratones  $\alpha_{1B} +/+$  mediante el test de la *t* de Student:  $^{NS}p > 0,05$ .

### 5.5. La potenciación de la liberación mediada por ésteres de forbol muestra una diferente dependencia de $[Ca^{2+}]_{ext}$ en las terminaciones nerviosas con canales N y P/Q.

La inesperada pérdida de la potenciación por ésteres de forbol en los ratones carentes de canal de calcio de tipo N, unida a la magnitud similar de la potenciación mediada por mGluR7 y ésteres de forbol, indicarían que las dos respuestas tienen lugar exclusivamente en terminaciones con canales N. Atendiendo a las evidencias que muestran que los canales de calcio de tipo P/Q están acoplados de forma más eficiente a la liberación de glutamato que los de tipo N (Mintz y cols., 1995; Qian y Noebels, 2001; Wu y cols., 1999; Millán y cols., 2003) (fig. IV. 2 y IV. 17) decidimos estudiar la posibilidad de que la respuesta a los ésteres de forbol presentara distintos requerimientos de calcio dependiendo del tipo de canal expresado en la terminación nerviosa. Para ello, determinamos la liberación de glutamato inducida con ionomicina en sinaptosomas de ratones  $\alpha_{1B} +/+$  tratados con PDBu a diferentes concentraciones de calcio extracelular,  $[Ca^{2+}]_{ext}$ : 1,33; 0,5 y 0,1 mM. A la  $[Ca^{2+}]_{ext}$  normal (1,33 mM), la potenciación de la liberación inducida por PDBu fue de un  $183,7 \pm 4,1$  % respecto al control ( $n=5$ ;  $p<0,01$ ) (fig. IV. 34 A y B). Potenciación que desapareció con la bajada de  $[Ca^{2+}]_{ext}$  a 0,5 mM ( $102,1 \pm 3,4$  % respecto al control;  $n=5$ ;  $p>0,05$ ). Sin embargo, a bajas concentraciones de  $Ca^{2+}$  extracelular (0,1 mM), PDBu potenció significativamente la liberación de glutamato ( $178,9 \pm 7,8$  % respecto al control;  $n=5$ ;  $p<0,01$ ). Esta respuesta de PDBu a bajas  $[Ca^{2+}]_{ext}$  (0,1 mM) exhibió propiedades semejantes a la potenciación observada a  $[Ca^{2+}]_{ext}$  normal (1,33 mM). Así, la respuesta resultó insensible al inhibidor específico de PKC, bisindolilmaleimida ( $181,1 \pm 10,0$  % respecto al control sin PDBu;  $n=4$ ;  $p<0,01$ ) (datos no mostrados), pero se bloqueó con el inhibidor del sitio de unión de DAG, calfoestina C ( $100,8 \pm 6,1$  % respecto al control;  $n=4$ ;  $p>0,05$ ); lo que confirma la implicación de Munc 13-1 en dicha potenciación a bajo calcio. Además, a diferencia de la potenciación por PDBu a  $[Ca^{2+}]_{ext}$  1,33 mM, que no se observó en los ratones  $\alpha_{1B} -/-$  ( $102,6 \pm 5,6$  respecto al control;  $n=9$ ;  $p>0,05$ ), la potenciación de la liberación a  $[Ca^{2+}]_{ext}$  0,1 mM no fue afectada por la pérdida del canal de calcio de tipo N ( $180,0 \pm 3,8$  respecto al control;  $n=4$ ;  $p<0,01$ ) (fig. IV. 34 B y C). Estos datos sugieren que la respuesta de PDBu a alta  $[Ca^{2+}]_{ext}$  (1,33 mM) tiene lugar en terminaciones sinápticas con canales N, mientras que la respuesta a baja  $[Ca^{2+}]_{ext}$  (0,1 mM) se produce, en terminaciones sinápticas con canales P/Q.

Munc 13-1, aparte de los dominios de unión a calcio y a DAG (Brose y cols., 1995), exhibe un dominio de unión a calmodulina, cuya activación parece estar implicada en procesos de potenciación a corto plazo (Junge y cols., 2004) y se han determinado varios estados de activación dependiendo de el número de iones  $\text{Ca}^{2+}$  que se unan a calmodulina (Rodríguez Castañeda y cols., 2009). Por ello, nos planteamos si la interacción Munc 13-1-calmodulina podría explicar las diferencias en los requerimientos de calcio extracelular que presenta la potenciación por ésteres de forbol. Para ello, realizamos experimentos en sinaptosomas tratados tanto con PDBu como con el inhibidor de calmodulina, calmidazolium. Los datos muestran que tanto a alta  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  (1,33 mM) ( $95,3 \pm 2,9$  % respecto al control sin tratar con PDBu;  $n=4$ ;  $p>0,05$ ) como a baja  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  (0,1 mM) ( $98,3 \pm 4,4$  %;  $n=4$ ;  $p>0,05$ ) (fig. IV. 34 A y B) el antagonista de calmodulina suprimió la potenciación de la liberación de glutamato. Por tanto, parece que ambas respuestas requieren la acción de calmodulina.



**Figura IV. 34.** La potenciación por ésteres de forbol muestra una diferente dependencia de la concentración extracelular de  $Ca^{2+}$  en los botones sinápticos con canales N y en los botones sinápticos con canales P/Q.

Los sinaptosomas de corteza cerebral tanto de ratones  $\alpha_{1B} (+/+)$  (A) como  $\alpha_{1B} (-/-)$  (C) se incubaron media hora en presencia de adenosina desaminasa (1,25 U/mg proteína) y tanto en presencia como en ausencia (control) de PDBu 1  $\mu$ M durante los últimos 2 minutos. Los sinaptosomas de ratones  $\alpha_{1B} (+/+)$  (A) que fueron tratados con PDBu también se incubaron tanto en presencia (registro de trazo discontinuo) como en ausencia del inhibidor de calmodulina, calmidazolium 1  $\mu$ M durante la última media hora. A continuación, los sinaptosomas se lavaron mediante centrifugación y resuspensión y se determinó la liberación de glutamato inducida por ionomicina 2  $\mu$ M a las  $[Ca^{2+}]_{ext}$  indicadas. Los diagramas de barras (C y D) representan el efecto del tratamiento con PDBu (barra sin relleno, trazo continuo) a las  $[Ca^{2+}]_{ext}$  indicadas tanto en sinaptosomas de ratones  $\alpha_{1B} (+/+)$  (B) como  $\alpha_{1B} (-/-)$  (D) y tanto en presencia (barra de trazo discontinuo) como en ausencia del inhibidor de calmodulina, calmidazolium. El efecto del tratamiento con PDBu se representó como una normalización respecto al control (barra con relleno), que fue la liberación de glutamato inducida por ionomicina (2  $\mu$ M) en sinaptosomas no tratados con PDBu. Los resultados representan la media  $\pm$  error típico de 4-9 experimentos realizados en 4-9 preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística se calculó comparando los resultados con los valores control en ausencia de tratamiento mediante el test de la *t* de Student: <sup>NS</sup> $p > 0,05$ ; <sup>\*\*</sup> $p < 0,01$ .

## **V. DISCUSIÓN**

## 1. Modulación de canales P/Q por mGluR7 en el hipocampo.

### 1.1. mGluR7 es el receptor responsable de las respuestas a L-AP4.

Los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III que se expresan en el cerebro exhiben baja (mGluR7) y alta afinidad (mGluR4 y mGluR8) por el agonista L-AP4 (Okamoto y cols., 1994; Saugstad y cols., 1994; Conn y Pin, 1997; Schoepp y cols., 1999; Cartmell y Schoepp, 2000). El hecho de que concentraciones bajas del agonista L-AP4 (20  $\mu$ M) apenas reduzcan la liberación de glutamato (7%) mientras que concentraciones más altas (1 mM) inhiban efectivamente la liberación de neurotransmisor (33%; fig. IV. 1), señala a mGluR7 como receptor responsable de esta respuesta en los botones sinápticos de hipocampo de rata adulta. Estos datos funcionales concuerdan con los datos de inmunocitoquímica, que muestran que, de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III, únicamente mGluR7 lo hace de forma relativamente abundante en la preparación de sinaptosomas de hipocampo. Estos datos también coinciden con el alto contenido en ARN mensajero y proteína de mGluR7 descrito en el hipocampo de ratas adultas (Ohishi y cols., 1995; Bradley y cols., 1996; Shigemoto y cols., 1996 y 1997; Kinoshita y cols., 1998). Aunque los receptores de alta afinidad por L-AP4, como mGlu4 y mGlu8, también están presentes en el hipocampo, su expresión está más restringida que la de mGluR7 en la rata adulta (Shigemoto y cols., 1997).

Además, el papel dominante de mGluR7 en el control de la liberación de glutamato en las terminaciones nerviosas de hipocampo concuerda con el cambio ligado al desarrollo de las sinapsis de hipocampo, donde se pasa de un control de la transmisión sináptica compartido entre receptores de alta y baja afinidad por L-AP4 en las ratas jóvenes (Baskys y Malenka, 1991; Capogna, 2004; Ayala y cols., 2008) a una situación en la que la reducción de la transmisión sináptica excitadora se debe exclusivamente a receptores de baja afinidad en los animales adultos (Gereau y Conn, 1995). Este cambio que, a lo largo del desarrollo, sufre la modulación de la liberación por receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III, también tiene lugar en la corteza cerebral. Donde se ha descrito que el receptor de baja afinidad por L-AP4, mGluR7, reduce la liberación de glutamato en ratas adultas (Millán y cols., 2002a, 2003), mientras que, en los animales jóvenes (2-3 semanas), en cambio, inhiben la liberación de glutamato tanto receptores de baja (mGluR7) como de alta afinidad (mGluR4) (Herrero y cols., 1996; Millán y cols., 2002b).

## 1.2. mGluR7 inhibe el componente de liberación de glutamato asociado a canales de calcio de tipo P/Q.

En la sinapsis de hipocampo de ratas jóvenes, el bloqueo de los canales de calcio de tipo P/Q con  $\omega$ -agatoxina-IVA suprime la neurotransmisión glutamatérgica mientras que, el bloqueante de los canales de calcio de tipo N,  $\omega$ -conotoxina-GVIA, tiene un efecto mucho más reducido (Luebke y cols., 1993; Takahashi y Momiyama, 1993; Wheeler y cols., 1994). También se ha descrito que el desarrollo implica un aumento de la participación de los canales de calcio de tipo P/Q en la transmisión glutamatérgica en detrimento de los canales de tipo N (Scholtz y Miller, 1995 y 1996; Iwasaki y cols., 2000). Además, se ha observado previamente que mGluR7 suprime casi completamente la transmisión sináptica en algunas sinapsis de hipocampo (Macek y cols., 1998). Todos estos datos concuerdan con los resultados de nuestro trabajo, con el que hemos confirmado que mGluR7 inhibe la liberación de glutamato y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediadas por canales P/Q en las terminaciones sinápticas de hipocampo. Esto se observó tanto en terminaciones sinápticas de ratones control, bloqueando los canales de tipo N con  $\omega$ -conotoxina (fig. IV. 1) o reduciendo la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (fig. IV. 2), como en terminaciones sinápticas de ratones que carecen de canal N (fig. IV. 14).

No obstante, los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III también reducen la transmisión glutamatérgica acoplada a canales de calcio de tipo N en las sinapsis de hipocampo (Gereau y Conn, 1995; Macek y cols., 1996 y 1998; Capogna, 2004; Pelkey y cols., 2005). Nuestros datos demuestran que mGluR7 también es capaz de modular el componente de liberación de glutamato asociado a los canales de tipo N en las terminaciones nerviosas de hipocampo de rata adulta. A pesar de que estos canales sólo controlan una pequeña fracción de la liberación de glutamato (Millán y cols., 2002a).



### 1.3. Mecanismo de inhibición de la liberación por mGluR7: canales de $\text{Ca}^{2+}$ de tipo P/Q y AMPc.

mGluR7 reduce la liberación de glutamato inducida por despolarización en las terminaciones nerviosas de hipocampo en paralelo a una disminución de la entrada de calcio. Puesto que estas respuestas tienen lugar sin ningún cambio apreciable en los niveles de AMPc, parece razonable pensar que la reducción de la liberación es consecuencia directa de la inhibición de la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje (Takahashi y cols., 1996).

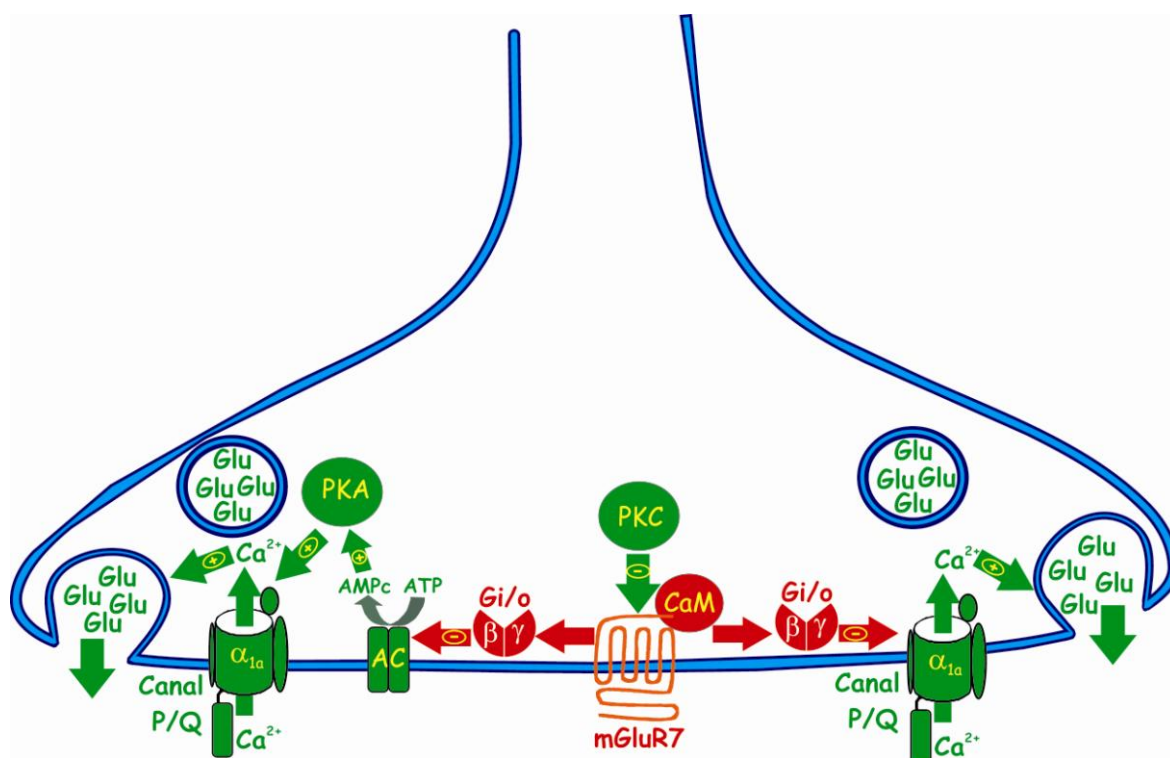
Esta inhibición de la liberación es suprimida por la toxina pertúsica resultando insensible a los inhibidores de PKA y PKC, lo que sugiere que esta respuesta de mGluR7 está mediada por un mecanismo limitado a membrana que implica la interacción entre subunidades  $\beta\gamma$  de proteínas Gi/o y los canales de calcio de tipo P/Q que tiene lugar en ausencia de segundos mensajeros que pudieran activar dichas quinasas. Esta propuesta estaría de acuerdo con la localización de este receptor en la zona activa presináptica de las sinapsis asimétricas (Ohishi y cols., 1995; Shigemoto y cols., 1996; Li y cols., 1997), donde se localizan también los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje.

Se ha descrito en células granulares de cerebelo, transfectadas con receptores mGluR7 recombinantes, la inhibición de corrientes somáticas de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q, y que esta respuesta implica la señalización del receptor vía activación de PLC y PKC (Perroy y cols., 2000). No obstante, hay que tener en cuenta que numerosos trabajos han puesto de manifiesto que la modulación que ejerce mGluR7 en sitios somáticos podría diferir de la observada en las terminaciones sinápticas. Por un lado, la inhibición de los canales de calcio de tipo P/Q somáticos es una respuesta irreversible y dependiente de PKC mientras que, en las terminaciones sinápticas, esta respuesta desaparece con la retirada de agonista mediante lavado (Macek y cols., 1998) y no requiere la activación de PKC (Macek y cols., 1998; Millán y cols., 2002a). Por otro lado, hay que señalar que, en las células granulares de cerebelo, la activación de PKC con ésteres de forbol mimetiza la inhibición de los canales P/Q inducida por mGluR7 mientras que, este mismo tratamiento, suprimió la acción inhibidora de mGluR7 tanto sobre la transmisión sináptica (Macek y cols., 1998) como sobre la liberación de glutamato (Millán y cols., 2002a). Además, hay que tener en cuenta que la supresión que ejerce PKC sobre las respuestas de los receptores metabotrópicos de glutamato presinápticos es un fenómeno bastante extendido que parece tener lugar a dos niveles; bien alterando la vía de señalización

puesta en marcha por los propios receptores (Nakajima y cols., 1999; O'Connor y cols., 1999), bien, en una etapa posterior, bloqueando la interacción entre las subunidades  $\beta\gamma$  de la proteína Gi/o y el canal de calcio (Zamponi y cols., 1997; Hamid y cols., 1999).

Otra divergencia importante entre la modulación de los canales P/Q por mGluR7 a nivel somático y sináptico surge de su relación con el papel de calmodulina. La unión de calmodulina al dominio C-terminal de mGluR7 favorece la liberación de las subunidades  $\beta\gamma$  posibilitando así su unión a los canales de calcio y, en consecuencia, la inhibición de la transmisión sináptica (O'Connor y cols., 1999). Dado que PKC mimetiza la activación del receptor bloqueando los canales P/Q en células granulares de cerebelo (Perroy y cols., 2000), mientras que la fosforilación de los receptores mGluR7 sinápticos por esta quinasa antagoniza su unión a calmodulina (Nakajima y cols., 1999; Airas y cols., 2001), se podría anticipar que la inhibición de los canales P/Q a nivel somático es independiente de calmodulina. Por tanto, mientras que la interacción con calmodulina no parece necesaria para la modulación de los canales de calcio por los receptores somáticos (Guo e Ikeda, 2005), por el contrario, dicha interacción es imprescindible para las respuestas sinápticas de mGluR7, tanto en neuronas autópticas (O'Connor y cols., 1999), como en rodajas de hipocampo (Capogna 2004) así como en terminaciones sinápticas de corteza cerebral (Millán y cols., 2002a).

Podemos concluir, por tanto, que mGluR7 desencadena dos vías de señalización diferenciadas, integrando así los efectos que sobre la liberación de glutamato tienen los niveles de calcio y AMPc así como la actividad de PKA (fig. IV. 1). Por un lado, la inhibición de la liberación de glutamato mediada por canales de calcio de tipo P/Q implica un mecanismo limitado a membrana consistente en una interacción dependiente de calmodulina de las subunidades  $\beta\gamma$  de proteínas Gi/o con los canales de calcio que tiene lugar de forma independiente de la activación de PLC y PKC. Este mecanismo sería similar al encontrado en las terminaciones sinápticas de corteza cerebral (Millán y cols., 2002a). Por otro lado, mGluR7 reduce los niveles de AMPc previamente activados con forskolina, reduciendo así la facilitación de la liberación inducida por PKA, de acuerdo con lo descrito en las terminaciones sinápticas de corteza cerebral (Millán y cols., 2002a).



**Figura V. 1. Mecanismos de acción propuestos para la inhibición de la liberación de glutamato acoplada a canales de calcio de tipo P/Q por mGluR7.**

El esquema ilustra los dos mecanismos de acción puestos en marcha por mGluR7 en los botones sinápticos de hipocampo de rata adulta y que tienen como resultado la inhibición del componente de liberación controlado por canales de calcio de tipo P/Q. Por un lado, el receptor inhibe la actividad de los propios canales de calcio mediante un mecanismo limitado a membrana mediado por proteínas G heterotrámicas sensibles a toxina pertúsica (Gi/o) pero que no requiere la activación de PLC o PKC, siendo por el contrario, inhibido por esta última. Por otra parte, la activación de la vía de adenilato ciclasa (AC) y PKA mediante forskolina desenmascara la capacidad de mGluR7 para reducir los niveles de AMPc y, por tanto, también la liberación de glutamato.

## 2. mGluR7 inhibe la liberación de glutamato tanto en botones sinápticos con canales N como P/Q, pero siempre va acompañado de los receptores GABA<sub>B</sub> y adenosina A<sub>1</sub>.

Se sabe poco acerca de los factores que determinan la dotación de receptores de una terminación sináptica, aunque se ha descrito el papel de la neurona postsináptica en este proceso. En este sentido, es posible observar diferentes propiedades de liberación entre varios botones presinápticos procedentes de un mismo axón dependiendo de las características de su diana postsináptica. Así, en la región CA1 del hipocampo, las terminaciones sinápticas de las células piramidales que establecen sinapsis con interneuronas que expresan el receptor metabotrópico de glutamato mGlu1 tienen un contenido diez veces mayor en mGluR7 que aquellas que contactan con otras neuronas piramidales u otros tipos de interneuronas (Shigemoto y cols., 1996).

Hecho que se confirmó cuando se observó que el agonista L-AP4 inhibe selectivamente la transmisión sináptica en aquellas terminaciones nerviosas que contactan con dichas interneuronas (Sanziani y cols., 1998).

Dado que la mayoría de los receptores presinápticos inhiben canales de calcio dependientes de voltaje (Scholz y Miller, 1991; Yawo y Chuma, 1993; Wu y Saggau, 1994 y 1995; Zhang y Schmidt, 1998; Brager y cols., 2003; Millán y cols., 2003; Manita y cols., 2004), el tipo de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  que expresa un botón sináptico podría afectar a su dotación de receptores. Los receptores metabotrópicos inhiben la actividad de los canales de calcio mediante una mecanismo limitado a membrana que activa proteínas G y libera subunidades  $\beta\gamma$  que se unen e inhiben al canal de calcio (De Waard y cols., 1997). Sin embargo, los dos tipos principales de canales de calcio que controlan la transmisión sináptica en las sinapsis excitadoras (N y P/Q) no son igualmente susceptibles a la inhibición por proteínas G, siendo los de tipo N más susceptibles que los de tipo P/Q (Zhang y cols., 1996; Currie y Fox, 1997; Colecraft y cols., 2000; González-Inchauspe y cols., 2007). Por otro lado, está bien establecido que la inhibición de los canales de calcio por proteínas G puede revertirse mediante una despolarización intensa (Elmslie y cols., 1990) así como mediante la fosforilación de los canales por PKC (Hamid y cols., 1999) dando lugar a una facilitación de entrada de calcio. En este sentido, cabe resaltar que los canales de calcio de tipo N y P/Q también divergen en cuanto su capacidad de facilitación (Herlitze y cols., 2001).

Los canales de calcio de tipo N están acoplados de forma menos eficiente a la liberación que los de tipo P/Q (Wu y cols., 1999). En este sentido, la introducción de quelantes de calcio en los botones sinápticos afecta preferentemente a la liberación acoplada a canales de calcio de tipo N (Millán y cols., 2002c; González-Inchauspe y cols., 2007) (fig. IV. 2), lo que sugiere que la distinta eficiencia de los canales N y P/Q en el control de la liberación podría deberse a una diferente localización respecto al sensor de calcio desencadenante de la exocitosis. En esta misma línea, existen evidencias que muestran que los canales de calcio de tipo P/Q se localizan más cerca de los sitios de liberación que los de tipo N (Wu y cols., 1999; Millán y cols., 2003; González-Inchauspe, 2007). En consecuencia, si la entrada de calcio a través de los canales de calcio de tipo N es menos eficiente desencadenando la exocitosis de glutamato se podría inferir que se requiere un flujo de calcio mayor por los canales N para desencadenar una liberación de glutamato similar a la que provocan los canales P/Q. Por tanto, cabe esperar que la inhibición de los canales N por receptores metabotrópicos tenga un mayor impacto en la liberación de glutamato. Esto unido al hecho de que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N son más susceptibles a la

inhibición por proteínas G, podría explicar la menor eficiencia sináptica de los sitios de liberación con canales N (Zhang y cols., 1996; Currie y Fox, 1997; Millán y cols., 2003; González-Inchauspe y cols., 2007).

En las terminaciones sinápticas de corteza cerebral, los receptores de adenosina A<sub>1</sub> inhiben tanto la liberación acoplada a canales de calcio de tipo N como a canales de calcio de tipo P/Q (Vázquez y Sánchez-Prieto, 1997; Ladera y cols., 2007), mientras que los receptores mGluR7 y GABA<sub>B</sub> reducen exclusivamente la liberación de glutamato controlada por canales de calcio de tipo N. Estos datos coinciden con la desaparición de la oclusión de las respuestas de los tres receptores en los ratones que carecen del canal de calcio de tipo N (ratones  $\alpha_{1B}$  -/-) (fig. IV. 13). Esta ausencia de oclusión de las respuestas en los ratones  $\alpha_{1B}$  -/- se observa a baja concentración de calcio extracelular, una condición en la que la liberación acoplada a canales de calcio de tipo P/Q es más susceptible a la inhibición por receptores metabotrópicos. El hecho de que la oclusión de las respuestas inhibitoras de mGluR7, GABA<sub>B</sub> y adenosina A<sub>1</sub> se restrinja a terminaciones sinápticas que contengan canales de calcio de tipo N, nos podría llevar a especular que, factores como la elevada susceptibilidad a la inhibición por proteínas G o el peor acoplamiento a la exocitosis de los canales de calcio de tipo N, sean los que determinen la abundancia de estos receptores metabotrópicos en las terminaciones sinápticas que expresan este tipo de canal de calcio. Sin embargo, en las terminaciones sinápticas de hipocampo, esta oclusión de las respuestas de los tres receptores se observa también en terminaciones donde la liberación de glutamato está controlada por canales de calcio de tipo P/Q (fig. IV. 16), por tanto, deben existir otros factores responsables de la colocación de estos receptores. Uno de esos factores podría ser la afinidad de estos receptores por su agonista endógeno. Parece poco probable que la coexistencia de los receptores esté determinada por la distribución de los receptores de adenosina A<sub>1</sub>, ya que éstos también inhiben la liberación de glutamato controlada por canales de calcio de tipo P/Q en las terminaciones de la corteza cerebral, mientras que la oclusión de las respuestas de los receptores sólo afecta a la liberación controlada por canales de calcio de tipo N. De igual manera, tampoco parece que el receptor GABA<sub>B</sub> sea el determinante de la colocación ya que, aunque es capaz de modular la liberación de glutamato en las terminaciones sinápticas de corteza cerebral de los ratones  $\alpha_{1B}$  -/-, en condiciones de bajo calcio extracelular (fig. IV. 13 E), su respuesta no ocluye a la del receptor de adenosina A<sub>1</sub>. Sin embargo, es posible que la coexistencia de los tres receptores esté determinada por la presencia de mGluR7, dada su baja afinidad por glutamato (Okamoto y cols., 1994; Saugstad y cols., 1994; Conn y Pin, 1997). Puesto que estos tres receptores

inhiben la liberación de glutamato mediante una vía de señalización común (Ladera y cols., 2007), la coexistencia de los mismos aumentaría considerablemente la probabilidad de activación del mecanismo de inhibición de la liberación. Este incremento en la probabilidad de activación de la vía de señalización inhibidora cobra especial relevancia en el caso de mGluR7, dada su baja afinidad por el agonista endógeno (Okamoto y cols., 1994), lo que restringe su activación a periodos de intensa actividad presináptica (Pelkey y cols., 2005). De este modo, la coexistencia de estos tres receptores metabotrópicos facilitaría la puesta en marcha del mecanismo inhibidor a concentraciones más bajas de agonista, si alguno de los receptores está activado de manera tónica.

Parece razonable que el fenómeno de oclusión de las respuestas inhibitoras que hemos descrito en las terminaciones sinápticas de corteza cerebral e hipocampo no se limite sólo a los tres receptores que han sido objeto de estudio (mGluR7, GABA<sub>B</sub>, adenosina A<sub>1</sub>) sino que abarque a muchos otros receptores que modulan la liberación de glutamato, tales como receptores muscarínicos (Qian y Saggau, 1997),  $\alpha$ -adrenérgicos (Scanziani y cols., 1993) u opioides (Simmons y Chavkin, 1996). Otro candidato podría ser el receptor de cannabinoides CB<sub>1</sub>, considerado el más abundante en las terminaciones nerviosas excitadoras (Katona y cols., 2006) y que inhibe tanto la entrada de calcio como la liberación de glutamato acoplada a canales de calcio de tipo N (Wilson y Nicoll, 2001; Liang y cols., 2004; Kushmerick y cols., 2004; Godino y cols., 2005 y 2007). Así mismo, la acción inhibidora del receptor de kainato converge con la de los receptores de adenosina A<sub>1</sub> y GABA<sub>B</sub> en las sinapsis entre los axones colaterales de Schaffer y las células piramidales de la región CA1 del hipocampo (Partovi y Frerking, 2006).

Esta abundancia de receptores capaces de inhibir la liberación de glutamato podría implicar la existencia de sinapsis que requieren un estricto control presináptico. Si bien nuestros resultados indican que la coexistencia de receptores tiene lugar tanto en terminaciones nerviosas con canales de calcio de tipo N como de tipo P/Q, sorprende el hecho de que la redundancia de receptores inhibidores tenga lugar en botones sinápticos con canales de calcio de tipo N, mal acoplados a la maquinaria exocitótica (Wu y cols., 1999; Millán y cols., 2003; González-Inchauspe y cols., 2007). Cabe la posibilidad de que éstos botones sinápticos estén dotados de mecanismos de facilitación de la liberación intrínsecos que compensen tanto la restricción en la entrada de calcio impuesta por los receptores acoplados a proteínas G como la mayor distancia respecto a los sitios de liberación.

Puesto que mGluR7 inhibe la liberación de glutamato mediada tanto por canales N, en los botones sinápticos de la corteza cerebral, como por

canales P/Q, en los botones sinápticos de hipocampo y que, en ambos casos, tiene lugar la oclusión de las respuestas inhibitoras de los tres receptores, podemos concluir que la respuesta inhibitora de mGluR7 no depende del tipo de canal de calcio que exprese la terminación sináptica sino que parece más bien relacionada con la presencia heterorreceptores que cooperen con mGluR7 en la inhibición de la liberación de glutamato.

### **3. Propiedades diferenciales de la liberación en botones sinápticos que expresan canales N ó canales P/Q.**

#### **3.1. mGluR7 inhibe la liberación mediada por canales P/Q en el hipocampo pero no en la corteza cerebral.**

Si bien la liberación de glutamato inducida por KCl depende en gran medida de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  del tipo P/Q y en menor proporción de los canales del tipo N, los botones sinápticos de la corteza cerebral de los ratones que carecen de canales de calcio de tipo N ( $\alpha_{1B}^{-/-}$ ) presentan una magnitud de liberación similar a la de los animales control, pero exclusivamente dependiente de canales de calcio de tipo P/Q (fig. IV. 10). Esta sustitución de canales N por P/Q está de acuerdo con el incremento en la expresión de la subunidad principal de los canales de calcio de tipo P/Q ( $\alpha_{1A}$ ) que se observa en los ratones carentes de canales N (Takahashi y cols., 2004). Ahora bien, en las terminaciones sinápticas de la corteza cerebral, los canales P/Q no sustituyen todas las funciones de los canales N, como es el caso de la inhibición de la liberación que comparten los receptores metabotrópicos mGluR7,  $\text{GABA}_B$  y adenosina  $A_1$ , porque, en los botones sinápticos de corteza cerebral de ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$ , desaparece la inhibición por mGluR7 (fig. IV. 10). Sin embargo, los resultados de inmunocitoquímica obtenidos en la preparación de sinaptosomas de los ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$  (fig. IV. 11) indican que la expresión de mGluR7 es normal, lo que sugiere que la síntesis y transporte del receptor a los terminales sinápticos no están alterados. Dado que los botones corticales de estos ratones conservan otras respuestas de mGluR7, como la modulación de la vía adenilato ciclasa/AMPC/PKA (fig. IV. 12), y que el receptor inhibe la liberación de glutamato mediada por canales P/Q en el hipocampo, resulta difícil explicar por qué, en los ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$ , los receptores mGluR7 de la corteza cerebral no pueden modular la liberación de glutamato mediada por canales P/Q. Cabe la posibilidad de que la organización del complejo de señalización de mGluR7

requiera algunas proteínas distintas en los botones sinápticos con canales N y en los botones sinápticos con canales P/Q.

### **3.2. El peor acoplamiento de los canales de calcio de tipo N a la liberación de glutamato es una propiedad intrínseca independiente de la inhibición por proteínas G.**

Durante el desarrollo tienen lugar cambios en el acoplamiento de los canales de calcio a liberación de glutamato. Así, en las sinapsis del cáliz de Held de animales jóvenes, la liberación de neurotransmisor está controlada por múltiples subtipos de canales de calcio mientras que, en sinapsis más maduras, los canales de calcio de tipo P/Q asumen un papel predominante en el control de la liberación (Fedchyshyn y Wang, 2005). Sin embargo, en las sinapsis de la corteza cerebral y del hipocampo de animales adultos, los canales N mantienen parte del control de la liberación de glutamato (Iwasaki y cols., 2000).

Se sabe que las corrientes de calcio de tipo N se activan a potenciales menos negativos que las corrientes de tipo P/Q de lo que se puede inferir que la corriente de entrada de calcio por los canales de tipo N durante un potencial de acción será menor, dando como resultado una transmisión sináptica menos eficiente. En las terminaciones sinápticas de corteza cerebral adulta, la liberación de glutamato mediada por canales de calcio de tipo N es más sensible a la disminución de la concentración extracelular de calcio que la mediada por canales de calcio de tipo P/Q (fig. IV. 17 A). En los ratones  $\alpha_{1B}^{-/-}$ , donde toda la liberación está mediada por canales de calcio P/Q, se pierde el componente de liberación más sensible a la disminución del calcio extracelular (fig. IV. 17 B). Estos resultados, junto con la mayor sensibilidad de la liberación acoplada a canales N a los quelantes del calcio intracelular que muestra la liberación acoplada a canales de calcio de tipo N en los botones sinápticos de hipocampo (fig. IV. 2); sugieren el peor acoplamiento de los canales N a la liberación de glutamato en comparación con los canales P/Q. Esto podría deberse a que este tipo de canales estén más lejos de los sitios de liberación que los de tipo P/Q, con lo cual contribuyen de forma menos eficiente a la liberación (Wu y cols., 1999; Millán y cols., 2003).

A pesar de que los factores mencionados reducen la eficacia de los canales de tipo N para desencadenar la liberación, este tipo de canales está sometido además, a una gran presión inhibitoria por receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G, como son los receptores mGluR7, GABA<sub>B</sub> y adenosina A<sub>1</sub> (Ladera y cols., 2007) (fig. IV. 13). Este control presináptico redundante por receptores acoplados a proteínas G no tiene lugar en las terminaciones con



canales de calcio de tipo P/Q, al menos en la corteza cerebral. El mal acoplamiento a la exocitosis de los canales N es una propiedad intrínseca de los mismos sin relación con la profusión de receptores inhibidores, ya que la supresión con toxina pertúsica de la posible inhibición tónica por proteínas G de los canales de calcio no altera las diferencias observadas en el acoplamiento a la liberación de glutamato entre los canales de calcio de tipo N y de tipo P/Q (fig. IV. 17).

### **3.3. La liberación de glutamato mediada por canales N es más susceptible a la facilitación por PKC.**

En las terminaciones sinápticas de corteza cerebral, el éster de forbol PDBu potenció en mayor medida la liberación controlada por canales de calcio de tipo N. Esto se observó tanto aislando el componente de liberación de pendiente de canales N, mediante  $\omega$ -conotoxina-GVIA, como en las terminaciones sinápticas de ratones carentes canales N ( $\alpha_{1B}$  -/-), en los que toda la liberación de glutamato depende de los canales P/Q.

Además, PKC modula la actividad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto de forma directa, incrementando la corriente de entrada de calcio por éstos (Yang y Tsien, 1993; Stea y cols., 1995), como indirecta, mediante la fosforilación de la subunidad  $\alpha_1$  de estos canales y el consiguiente bloqueo de su inhibición por subunidades  $G\beta\gamma$  (Swartz y cols., 1993; Zamponi y cols., 1997; Hamid y cols., 1999; Herlitze y cols., 2001). Puesto que los canales N presentan una mayor inhibición por proteínas G (Zhang y cols., 1996; Currie y Fox, 1997; Colecraft y cols., 2000; González-Inchauspe y cols., 2007), esto explicaría su mayor facilitación por PKC.

PKC también puede facilitar la liberación de neurotransmisores actuando a nivel de la maquinaria exocitótica. La activación de PKC con ésteres de forbol aumenta el número de vesículas dispuestas para ser liberadas (RRP, del inglés *ready releasable pool*) (Ghirardi y cols., 1992; Gillis y cols., 1996; Smith y cols., 1998; Silinsky y cols., 2003) y mejora el acoplamiento entre calcio y exocitosis (Korogod y cols., 2007). En este sentido, se ha descrito la fosforilación por PKC de proteínas sinápticas como son SNAP-25 (Genoud y cols., 1999; Kataoka y cols., 2000; Nagy y cols., 2002; Houelan y cols., 2007), integrante del complejo SNARE, y Munc 18 (de Vries y cols., 2000; Barclay y cols., 2003; Craig y cols., 2003; Nili y cols., 2006), cuya fosforilación permite su disociación de syntaxina y la consiguiente formación del complejo SNARE (entre syntaxina, SNAP 25 y sinaptobrevina) (Dulubova y cols., 1999; Verhage y cols., 2000; Yang y cols., 2000; Misura y cols., 2000; de Vries y cols., 2000; Barclay y cols., 2003;

Craig y cols., 2003; Nili y cols., 2006), necesario para la hemifusión de la vesícula sináptica, que quedaría así dispuesta para ser liberada.

Además de PKC, los ésteres de forbol también pueden potenciar la transmisión sináptica mediante la activación de proteínas no quinasas (pero que poseen un dominio C<sub>1</sub> de unión a diacilglicerol) como la familia de proteínas munc 13 (Rhee y cols., 2002; Wierda y cols., 2007; Lou y cols., 2008). Las proteínas Munc 13 son proteínas de la zona activa esenciales para la liberación de vesículas sinápticas (Varoqueaux y cols., 2002) ya que, mediante su interacción con syntaxina, posibilitan la formación del complejo SNARE y la preparación de las vesículas sinápticas para su liberación (Brose y cols., 2000). Sería necesario determinar si la potenciación de la liberación inducida con 4-aminopiridina es sensible al inhibidor específico de PKC, bisindolilmaleimida, y a callostina C, para poder implicar a las proteínas Munc 13 en estas respuestas.

#### **4. mGluR7 potencia la liberación de glutamato.**

Como ya hemos explicado, está bien establecida la capacidad de mGluR7 para inhibir la liberación de glutamato mediante la reducción de la entrada de calcio a través de los canales dependientes de voltaje en la presinapsis. Sin embargo, nuestros experimentos en sinaptosomas de corteza cerebral ponen de manifiesto que, aparte de mediar la inhibición de la liberación de neurotransmisor, mGluR7 también activa una vía de señalización que conlleva la potenciación de la liberación de glutamato. Dicha potenciación requiere al menos una exposición de 10 minutos al agonista L-AP4 y, una vez establecida, anula la inhibición de la liberación inducida por una segunda exposición al agonista. A diferencia de la respuesta inhibitoria, en la que una proteína G sensible a PTx (Gi/o) reduce la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje, la respuesta potenciadora está mediada por una proteína G resistente a la toxina pertúsica que activa PLC, incrementando así la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato y la translocación dependiente de diacilglicerol de la proteína munc 13-1.

#### 4.1. mGluR7 activa PLC.

Aparte de las conocidas acciones inhibitoras de mGluR7 sobre los canales de calcio dependientes de voltaje (Millán y cols., 2002a y 2002b; Pelkey y cols., 2006) y la adenilato ciclasa (Millán y cols., 2002a), mediante sistemas de expresión heterólogos, se ha observado que este receptor también puede activar canales GIRK (canales rectificadores de la entrada de potasio dependientes de proteínas G) (Sorensen y cols., 2002) así como inhibir canales de  $\text{Ca}^{2+}$  somáticos mediante la activación de PLC (Perroy y cols., 2000). Sin embargo, se desconoce la relevancia fisiológica de estas vías de señalización a nivel presináptico, donde está localizado mGluR7 (Shigemoto y cols., 1996). Por el contrario, nuestro hallazgo de que receptores mGluR7 sinápticos activan PLC y potencian de la liberación de glutamato está de acuerdo con estudios de transmisión sináptica previos, donde se pone de manifiesto la implicación de una PLC presináptica en la potenciación sináptica observada en células de hipocampo en cultivo (Rosenmund y cols., 2002). En este estudio, el inhibidor de PLC, U-73122, bloqueó la potenciación de la liberación inducida por una estimulación de alta frecuencia. Dado que PLC es una enzima dependiente de calcio, se propuso que su activación se debía simplemente al incremento de calcio provocado por la estimulación de alta frecuencia. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que, además del calcio, la PLC presináptica también es activada por la acción de proteínas G sensibles a PTx activadas por mGluR7. A pesar de la baja afinidad de mGluR7 por su agonista (Okamoto y cols., 1994), parece razonable pensar que la estimulación de alta frecuencia podría incrementar la liberación de glutamato hasta niveles suficientes para activar a este receptor (Pelkey y cols., 2005) y que, por tanto, la activación de PLC atribuida al incremento de calcio pudiera estar mediada también por la activación de mGluR7.

No obstante, desconocemos la identidad de la isoforma de PLC implicada en la potenciación de la liberación mediada por L-AP4 observada en terminaciones nerviosas de corteza cerebral. En mamíferos, han sido identificadas al menos 13 isoformas de PLC pertenecientes a seis familias designadas como PLC $\beta$ , - $\gamma$ , - $\delta$ , - $\epsilon$ , - $\zeta$  y - $\eta$ , de las cuales, sólo las isoformas  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\eta$  se expresan abundantemente en el cerebro (Rhee, 2001; Rebecchi y cols., 2000; Hwang y cols., 2005). Aunque todas las isoformas de PLC catalizan la hidrólisis de fosfatidil inositol (4,5)-bifosfato con la consiguiente formación de DAG e  $\text{IP}_3$ , la presencia de distintos dominios de regulación las hace susceptibles a diferentes modos de activación. Si bien todas las isoformas de PLC requieren calcio para su activación son las isoformas  $\delta$ ,  $\zeta$  y  $\eta$  las más sensibles a este

cación. Además, mientras que las isoformas  $\beta$ ,  $\varepsilon$  y  $\eta$  son susceptibles de activación por la subunidades  $\beta\gamma$  de proteínas G, sólo la primera de ellas puede ser activada por subunidades  $\alpha$  de proteínas Gq (Rhee, 2001; Cockcroft, 2006). Por tanto, al menos tres isoformas distintas de PLC pueden ser activadas por receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G y, por consiguiente, podrían estar implicadas en la potenciación de la liberación inducida por mGluR7.

#### **4.2. La modulación de la liberación que ejerce mGluR7 es un balance entre inhibición y facilitación.**

Estudios recientes han puesto de manifiesto el control bidireccional de mGluR7 sobre la plasticidad sináptica en el hipocampo (Pelkey y cols., 2005). Así, en rodajas control, la activación de mGluR7 durante una estimulación de alta frecuencia provoca una depresión a largo plazo (LTD) de la transmisión sináptica entre las fibras musgosas y las interneuronas del *stratum lucidum*, que está causada por la disminución persistente de la liberación de glutamato como consecuencia de la activación del receptor. Sin embargo, en rodajas pretratadas con el agonista L-AP4, la estimulación de alta frecuencia produce una potenciación de la transmisión sináptica (LTP) que parece relacionada con la internalización del receptor (Pelkey y cols., 2007), y la pérdida de la inhibición. Sin embargo, la internalización de mGluR7 es un proceso parcial que no explicaría la pérdida total de su respuesta inhibitoria. Nuestro hallazgo de que mGluR7 puede activar PLC y potenciar la liberación de glutamato, contrarrestando así la respuesta inhibitoria, proporciona una explicación adicional y alternativa a la conversión de LTD en LTP, que tiene lugar en estas sinapsis. Parece que la desensibilización e internalización tras estimulación prolongada es una característica propia de los receptores acoplados a PLC, como los mGluR del grupo I (Dale y cols., 2001; Doherty y cols., 1999; Mundell y cols., 2001, 2003; Sallese y cols., 2000) que no muestran los receptores acoplados a adenilato ciclasa, como son los mGluR del grupo III. En este sentido, se ha observado que el receptor mGlu4 no experimenta desensibilización ni internalización por exposición prolongada a L-AP4, sin embargo, cuando el este receptor se coexpresa con una proteína G quimérica susceptible de activación por el receptor y capaz de activar a PLC (Gqo5), mGluR4 si experimenta una internalización dependiente de agonista (Mathiesen y Ramirez, 2006). Esto mismo podría ocurrir con mGluR7: cuando el receptor está acoplado a la vía inhibitoria no se desensibiliza ni internaliza, sino que sólo lo hace cuando se acopla a PLC, tras la estimulación prolongada.

La potenciación de la liberación inducida por L-AP4 que hemos observado en botones de corteza cerebral posee algunas características similares a la LTP que induce la estimulación de alta frecuencia en las rodajas de hipocampo tras su tratamiento con L-AP4 (Pelkey y cols., 2008). Así, en ambos tipos de sinapsis la potenciación de la liberación requiere una exposición prolongada a L-AP4 y tiene lugar a pesar de la reducción en la entrada de calcio. Sin embargo, mientras que la potenciación observada en las sinapsis entre fibras musgosas e interneuronas es suprimida tanto por el inhibidor de adenilato ciclasa, DDOA, como por el inhibidor de PKA, H-89; la potenciación que induce L-AP4 en las terminaciones nerviosas de corteza cerebral es insensible a estos fármacos aunque sí es bloqueada por el inhibidor de PLC, U-73122.

Ante este nuevo papel de mGluR7 como modulador bidireccional de la liberación de glutamato surge la cuestión de si existe una única población de botones en los que L-AP4 ejerce una modulación dual de la liberación o si, por el contrario, existen dos poblaciones de terminaciones sinápticas que expresen las diferentes respuestas del receptor. Así, una de ellas resultaría inhibida y la otra potenciada por el agonista con cinéticas distintas. No obstante, el hecho de que una segunda adición de L-AP4 no tenga efecto inhibitor sobre la liberación (fig. IV. 21 A) sugiere que mGluR7 inhibe y facilita la liberación de glutamato en la misma población de terminaciones nerviosas; de otro modo, este segundo pulso de L-AP4 debería reducir la liberación de neurotransmisor de la misma manera que inhibe la entrada de calcio (fig. IV. 21 C).

### 4.3. Participación de la proteína Munc 13-1.

La potenciación de la liberación por mGluR7 es insensible al inhibidote específico de PKC, bisindolilmaleimida, que bloquea el sitio de unión a ATP, pero se pierde con bloqueantes del sitio de unión de diacilglicerol (DAG), como calfostina C. Esto sugiere que la potenciación por mGluR7 depende de proteínas no quinasas activadas por DAG, como son las proteínas Munc 13. En este sentido, se ha descrito que receptores de histamina H<sub>1</sub> potencian la exocitosis de neurotransmisores mediante una vía de señalización que implica la activación de PLC por proteínas G<sub>q</sub> y que es dependiente de Munc 13-1 (Bauer y cols., 2007).

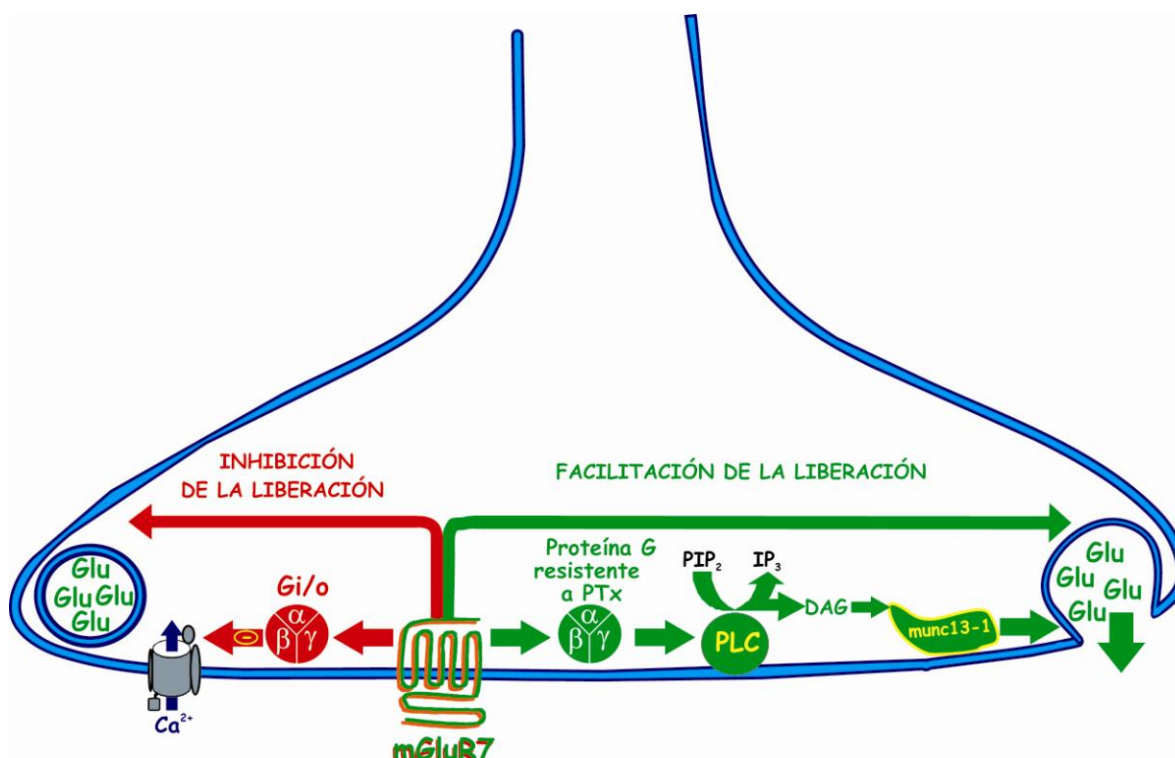
La familia de proteínas Munc 13 está compuesta por las isoformas Munc 13-1, Munc 13-2 y Munc 13-3 expresadas exclusivamente en la zona activa presináptica (Augustin y cols., 1999). La función principal de las proteínas Munc 13 es la preparación de las vesículas sinápticas para su liberación. Así, la

interacción de las proteínas Munc 13 con syntaxina posibilita la conformación abierta de esta última y el consiguiente ensamblaje del complejo SNARE (entre la propia syntaxina y las proteínas SNAP 25 y sinaptobrevina). De este modo, las vesículas sinápticas van a quedar hemifusionadas a la membrana plasmática y dispuestas para ser liberadas en el momento en el que un potencial de acción llegue a la presinapsis. Munc 13-1 es la isoforma con un patrón de expresión cerebral más amplio y su pérdida conlleva la muerte del animal a las pocas horas del nacimiento, así como el bloqueo de la práctica totalidad de la transmisión sináptica (Rhee y cols., 2002; Varoqueaux y cols., 2002). Además, esta proteína participa en los procesos de plasticidad sináptica, como son la facilitación de la liberación de neurotransmisores inducida por ésteres de forbol (Rhee y cols., 2002) o por estimulación repetida (Rosenmund y cols., 2002), ya sea mediante el incremento de la población de vesículas preparadas para la liberación o por el incremento de la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  de la fusión de las vesículas (Basu y cols., 2007). Por tanto, es probable que Munc 13-1 sea la isoforma responsable de la potenciación por mGluR7. En este sentido, se ha descrito que la activación de Munc 13-1 con ésteres de forbol provoca su translocación a la membrana plasmática (Betz y cols., 1998), lo que concuerda con nuestras observaciones en botones sinápticos, donde tanto la estimulación de mGluR7 como el tratamiento con ésteres de forbol translocan a Munc 13-1 de la fracción soluble a la de membrana (fig. IV. 25). Además, el hecho de que mGluR7 y Munc 13-1 coinmunoprecipiten sugiere que ambas proteínas se localizan en un mismo complejo proteico estable, pudiendo mantener tanto una interacción directa como indirecta. Estos resultados coinciden con estudios recientes que muestran la necesidad de la interacción de mGluR7 con otra proteína de la zona activa, RIM1 $\alpha$  (proteína que interacciona con Rab3a), para el establecimiento de un proceso una potenciación a largo plazo dependiente de adenilato ciclasa y PKA. Es más, el agonista L-AP4 impide la coinmunoprecipitación de mGluR7b y RIM1 $\alpha$ , sugiriendo que ambas proteínas también se localizan en el mismo complejo molecular y que su interacción se ve impedida por un proceso de activación/internalización del receptor. De este modo, esta asociación proporcionaría un potencial mecanismo molecular que explique el hecho de que la internalización de mGluR7 posibilite un proceso de LTP en las sinapsis entre fibras musgosas e interneuronas del stratum lucidum (Pelkey y cols., 2008). Cabe resaltar también que munc 13-1 interacciona con RIM1 $\alpha$  y que esta interacción posibilita el reclutamiento de munc 13-1 en la zona activa (Andrews-Zwilling y cols., 2006). Todos estos datos sugieren, por tanto, que los complejos de mGluR7 con proteínas de la zona activa podrían

tener un papel relevante en la modulación de la liberación de glutamato que ejerce el receptor.

#### **4.4. Relevancia fisiológica de la vía facilitadora de mGluR7.**

Con nuestro trabajo, hemos puesto de manifiesto un papel dual de mGluR7 en el control de la liberación de glutamato ya que el receptor puede tanto inhibir como facilitar dicho proceso (fig. V. 2). Parece razonable pensar que la retroalimentación negativa que sobre la liberación ejerce la respuesta inhibitoria de mGluR7 podría prevenir la acumulación de glutamato en la brecha sináptica y los consiguientes efectos neurotóxicos de ésta. Desconocemos, sin embargo, la importancia fisiológica de la nueva señalización puesta en marcha por mGluR7 para facilitar la liberación de glutamato. De hecho, dado que el receptor se acopla a la vía facilitadora de forma menos eficiente, como pone de manifiesto el requerimiento de exposiciones prolongadas al agonista (10 minutos), parecería que la principal función de mGluR7 es proporcionar un control inhibitorio a la sinapsis. Esto concuerda con el hecho de que la pérdida del receptor da lugar a un fenotipo convulsivo debido a la acumulación excesiva de glutamato en la sinapsis (Sansig y cols., 2001; Zhang y cols., 2008). El control dual de la liberación ejercido por mGluR7 podría tener un papel homeostático. De este modo, mGluR7 impediría que las sinapsis cayeran en un estado de depresión continua causado por la saturación de la respuesta inhibitoria de mGluR7 por una liberación continuada de neurotransmisor.



**Figura V. 2. Modulación dual de la liberación de glutamato mediada por mGluR7.**

El esquema ilustra las dos vías de señalización puestas en marcha por mGluR7.

Por un lado, exposiciones breves al agonista L-AP4 (1mM, 30 segundos) inician una cascada de señalización que activa a proteínas G sensibles a toxina pertúsica ( $\text{Gi/o}$ ) y que tiene como resultado una reducción en la entrada de calcio tras la despolarización con la consiguiente inhibición de la liberación de glutamato.

Por otro lado, exposiciones prolongadas al agonista (1mM, 10 min.) conducen a la potenciación de la liberación de glutamato. Esta potenciación de la liberación implica la activación de proteínas G resistentes a PTx que activan a la fosfolipasa C (PLC), incrementando la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ) y promoviendo la translocación dependiente de diacilglicerol (DAG) de la proteína munc 13-1.

#### 4.5. La modulación dual de la liberación no es una característica exclusiva de mGluR7.

mGluR7 coexiste en las terminaciones nerviosas glutamatérgicas con otros receptores presinápticos acoplados a proteínas G, como son los receptores de adenosina  $\text{A}_1$  y  $\text{GABA}_B$ , con los que coopera en la inhibición de la liberación de glutamato mediante una vía de señalización común (Ladera y cols., 2007) (fig. IV. 13 y 16). Por ello, lo primero que nos planteamos fue estudiar si estos receptores cooperan en la potenciación la liberación de glutamato. En este sentido, encontramos que, en las terminaciones nerviosas de corteza cerebral, una activación submáxima simultánea de estos tres receptores provocó una respuesta sinérgica (fig. IV. 28), aunque la magnitud de ésta no superó la activación máxima individual de mGluR7, indicando que, como ocurre con las



respuestas inhibitoras (fig. IV 13 y 16), las respuestas facilitadoras de estos tres receptores también se ocluyen. El hecho de que este fenómeno de convergencia de las respuestas potenciadoras de la liberación tenga lugar precisamente en las terminaciones nerviosas donde la liberación de glutamato está controlada por canales de calcio de tipo N, acoplados de forma muy poco eficiente a la liberación de neurotransmisor (Wu y cols., 1999; Millán y cols., 2003) (fig. IV. 2 y 17) podría hacer que cobrara sentido la abundancia de receptores presinápticos inhibidores que presentan estas terminaciones sinápticas. Parece que el más débil acoplamiento de los canales N a la exocitosis, junto con la presión inhibitora de proteínas G, dotaría a los botones sinápticos con canales N de rango dinámico para la facilitación de la liberación. Por todo esto, resultaría muy interesante determinar si la respuestas potenciadoras de estos receptores se limita a botones sinápticos con canales N o, como ocurre con la respuestas inhibitoras, también puede darse en botones sinápticos con canales P/Q.

El receptor GABA<sub>B</sub> también es capaz de potenciar la liberación de glutamato e incrementar la liberación de IP<sub>1</sub> (fig. IV. 27). Por tanto, este receptor también potencia la liberación de glutamato mediante la activación de PLC y la consiguiente hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>), sin embargo, a diferencia de mGluR7, la potenciación inducida por el receptor GABA<sub>B</sub> parece mediada una proteína G sensible a toxina pertúsica (fig. IV. 27 A y B).

## 5. Los ésteres de forbol ocluyen la potenciación de mGluR7.

En esta tesis doctoral hemos puesto de manifiesto que tanto los ésteres de forbol como la estimulación prolongada de mGluR7 potencian la liberación de glutamato a través de un mecanismo de señalización intracelular compartido, que se expresa en los botones sinápticos de la corteza cerebral con canales N. Además, hemos observado que PDBu, a diferencia de mGluR7, también potencia la liberación de glutamato en terminaciones que contienen canales de calcio de tipo P/Q, aunque esto ocurre sólo en condiciones de entrada reducida de Ca<sup>2+</sup>. La diferente dependencia de Ca<sup>2+</sup> de la potenciación mediada por PDBu entre las terminaciones sinápticas con canales de calcio de tipo N y las terminaciones sinápticas con canales P/Q no parece depender de la isoforma de Munc 13, ya que los dos tipos de botones sinápticos contienen tanto Munc 13-1 como Munc 13-2, pero podría estar relacionada con otras propiedades de la maquinaria de liberación pendientes de estudio.

### 5.1. La potenciación de mGluR7 se pierde en ratones que carecen de canales N.

La liberación de glutamato en las terminaciones sinápticas de la corteza cerebral está controlada tanto por canales de calcio de tipo N como de tipo P/Q (Vázquez y Sánchez-Prieto 1996; Millán y cols., 2002), aunque mGluR7 sólo inhibe la liberación mediada por canales N (Millán y cols., 2002a, 2003). La pérdida de la potenciación de la liberación mediada por mGluR7 que observamos en los botones sinápticos de la corteza cerebral de ratones carentes de canal de calcio de tipo N (ratones  $\alpha_{1B}$  -/-) (fig. IV. 30) concuerda con la pérdida de la respuesta inhibitoria (fig. IV. 10). Por tanto, la desaparición del canal de calcio de tipo N conlleva la pérdida de las modulaciones de la liberación por mGluR7. Nuestros datos ponen de manifiesto que esto no se debe a alteraciones en la síntesis, transporte o reparto del receptor, ya que las terminaciones nerviosas de corteza cerebral de ratones  $\alpha_{1B}$  -/-, donde toda la liberación de glutamato inducida está controlada por canales de calcio de tipo P/Q, presentan una expresión del receptor similar a las de los animales control (fig. IV. 11). Además, en ratones  $\alpha_{1B}$  -/-, sí tienen lugar otras respuestas de mGluR7, como la disminución de la liberación inducida por forskolina, que depende de la inhibición de la adenilato ciclasa y de los niveles de AMPc (Millán y cols., 2002a) (fig. IV. 12). Por tanto, la incapacidad del receptor tanto para inhibir la entrada de calcio y la liberación de glutamato como para potenciar la liberación del neurotransmisor que se observa en los animales  $\alpha_{1B}$  -/- podría deberse a alteraciones en la localización exacta de mGluR7 en la zona activa (Shigemoto y cols., 1996) que impidieran su interacción con los canales de calcio acoplados a la maquinaria de liberación. Como ya hemos comentado, aunque se han identificado algunas proteínas que interaccionan con mGluR7 (Enz, 2002a, 2002b; O'Connor y cols., 1999; Perroy y cols., 2002) se desconoce la organización del complejo presináptico alrededor de este receptor. La proteína PICK1 parece esencial para el agrupamiento del receptor en los sitios presinápticos (Boudin y cols., 2000) y para su acción inhibitoria sobre los canales de calcio (Perroy y cols., 2002) pero desconocemos que proteínas son importantes para el acoplamiento del receptor a las distintas vías de señalización (inhibición de los canales de  $Ca^{2+}$ , inhibición de la adenilato ciclasa y activación de PLC).

## 5.2. La potenciación por ésteres de forbol tiene el mismo perfil farmacológico que la mediada por mGluR7.

Los ésteres de forbol pueden potenciar la transmisión sináptica por mecanismos muy diferentes mediante la activación de PKC. La fosforilación de PKC de los canales de potasio provoca la reducción de la salida de este ión y el alargamiento de los potenciales de acción, con el consiguiente aumento de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y liberación de neurotransmisor (Barrie y cols., 1991; Stea y cols., 1995; Hamid y cols., 1999). Además, la fosforilación por PKC aumenta la actividad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto de forma directa, aumentando la corriente de calcio (Yang y Tsien, 1993; Stea y cols., 1995), como de forma indirecta, liberando a estos canales de su inhibición por proteínas G (Swartz, 1993; Swartz y cols., 1993; Zamponi y cols., 1997; Herlitze y cols., 2001). Sin embargo, parece que ninguno de estos mecanismos tendría relevancia en la potenciación por forboles que observamos, ya que inducimos la liberación de glutamato mediante ionomicina, ionóforo de calcio que se inserta en la membrana plasmática provocando una liberación de glutamato independiente de potenciales de acción y de los canales de calcio (Jovanovic y cols., 2000). PKC también puede facilitar la liberación de neurotransmisores actuando a nivel de la maquinaria exocitótica. De este modo, la fosforilación de PKC de proteínas implicadas en la formación del complejo SNARE, como SNAP 25 (Genoud y cols., 1999; Kataoka y cols., 2000; Nagy y cols., 2002; Houelan y cols., 2007) y Munc 18 (de Vries y cols., 2000; Barclay y cols., 2003; Craig y cols., 2003; Nili y cols., 2006), aumenta el número de vesículas dispuestas para ser liberadas (RRP) (Ghirardi y cols., 1992; Gillis y cols., 1996; Smith y cols., 1998; Silinsky y cols., 2003) y mejora el acoplamiento entre calcio y exocitosis (Korogod y cols., 2007). Sin embargo, la potenciación por ésteres de forbol es insensible al inhibidor de PKC, bisindolilmaleimida, que bloquea el sitio de unión a ATP, pero sensible al bloqueante del sitio de unión de DAG, callostina C (fig. IV. 29). Por tanto, parece razonable pensar que, al igual que la potenciación por mGluR7, la potenciación por los ésteres de forbol está mediada por proteínas no kinasas activadas por DAG, como son las proteínas Munc 13 (Rhee y cols., 2002). De esta manera, podemos concluir que la potenciación por ésteres de forbol y la mediada por mGluR7 comparten la vía de señalización intracelular, como confirma el hecho de que ambas respuestas se ocluyan (fig. IV. 29).

### 5.3. Los ésteres de forbol también potencian la liberación en botones sinápticos con canales P/Q, pero sólo a baja $[Ca^{2+}]_{ext}$ .

Dado el amplio patrón de expresión de Munc 13-1 en la corteza cerebral (Augustin y cols., 1999) comparado con la restringida distribución de mGluR7 y del canal N (Millán y cols., 2003), resulta sorprendente la pérdida de potenciación por ésteres de forbol en los ratones que carecen de canal N, así como que la magnitud de la potenciación por ésteres de forbol sea similar a la mediada por mGluR7. Puesto que la potenciación por ésteres de forbol que observamos depende de Munc 13-1, cabe la posibilidad de que la pérdida del canal N lleve asociada alguna alteración en el patrón de expresión estas proteínas. Sin embargo, la mayoría de las terminaciones sinápticas de la preparación de corteza cerebral expresan Munc 13-1 mientras que la distribución de Munc 13-2 es más restringida (fig. IV. 32). Estos datos coinciden con Augustin y cols., 1999; donde se muestra que munc 13-1 se expresa a lo largo de todo el cerebro mientras que munc 13-2 y munc 13-3 presentan un patrón de expresión excluyente, de manera que la primera se expresa preferentemente en el prosencéfalo quedando munc 13-3 restringida al cerebelo. Por tanto, dado que la liberación de glutamato en los botones sinápticos de la corteza cerebral está mediada tanto por canales N como P/Q (Millán y cols., 2002a, 2003) y que Munc 13-1 está ampliamente expresada en prácticamente toda la población, seguimos sin entender por qué la potenciación por PDBu se pierde en los ratones deficientes en canal N. Aunque la potenciación por ésteres de forbol se ha determinado con ionomicina y, por tanto, es independiente de los canales de  $Ca^{2+}$ , es posible que las terminaciones sinápticas con canales P/Q, acoplados de forma más eficiente a la liberación de glutamato que los de tipo N (Mintz y cols., 1995; Qian y Noebels, 2001; Wu y cols., 1999; Millán y cols., 2003), presenten menor rango dinámico para la función de Munc 13 que las terminaciones sinápticas con canales N; de manera que, en las condiciones de estimulación prolongada de nuestro experimento con  $[Ca^{2+}]_{ext}$  de 1,33 mM, se haya alcanzado un techo de liberación que impida observar una potenciación. Puesto que, en los ratones control, los ésteres de forbol potencian la liberación tanto a alta como a baja  $[Ca^{2+}]_{ext}$ , mientras que sólo lo hacen a baja  $[Ca^{2+}]_{ext}$  en los ratones que carecen de canal de calcio de tipo N (fig. IV. 34), parece razonable afirmar que la potenciación por ésteres de forbol a alta  $[Ca^{2+}]_{ext}$  tiene lugar en terminaciones sinápticas que contienen canales de calcio de tipo N. Cabe la posibilidad de que las terminaciones nerviosas con canales de calcio de tipo N o P/Q expresen diferentes isoformas de Munc 13. Sin embargo, nuestros resultados no apuntan en este sentido, ya que la población de terminaciones

nerviosas que expresa mGluR7, que sabemos que coincide exactamente con la población de terminaciones que contiene el canal de calcio de tipo N (Millán y cols., 2003), también expresa Munc 13-1 o Munc 13-2 o ambas isoformas. Por otro lado, aunque se ha observado que, al ser sometidas a un tren de estímulos, las sinapsis cuya transmisión sináptica depende exclusivamente de Munc 13-1 presentan una marcada tendencia a experimentar depresión a corto plazo mientras que aquellas que dependen de Munc 13-2 exhiben potenciación a corto plazo (Rosenmund y cols., 2002); hay que señalar que los ésteres de forbol potencian la transmisión sináptica en ambos tipos de sinapsis, aunque la magnitud de la potenciación es mayor en las sinapsis que dependen de Munc 13-2 (Rosenmund y cols., 2002).

El hecho de que los botones sinápticos con canales N y los botones sinápticos con canales P/Q expresen las mismas isoformas de Munc 13, hace poco probable la idea de que los distintos requerimientos de calcio extracelular de la potenciación por ésteres de forbol reflejen la activación por  $\text{Ca}^{2+}$  de las distintas isoformas de Munc 13. El calcio regula la actividad de las proteínas Munc 13, tanto por su unión directa, como por la unión dependiente de calcio de fosfolípidos y calmodulina (Junge y cols., 2004; Dimova y cols., 2006; Rodríguez-Castañeda y cols., 2009; Shin y cols., 2001), aunque no se han descrito diferencias en cuanto a la unión a  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina entre las distintas isoformas de Munc 13 (Dimova y cols., 2006). En consecuencia, la diferente dependencia al calcio extracelular de la potenciación inducida por PDBu en las terminaciones con canales N o P/Q parece estar relacionada con las condiciones necesarias para que se haga patente el incremento de vesículas preparadas para la liberación mediado por Munc 13 ya activadas, más que con posibles diferencias en las propiedades de activación de Munc 13-1 y Munc 13-2. Podría ser que las terminaciones sinápticas con canales de calcio tipo P/Q presenten un rango dinámico menor para la acción de Munc 13. Así, la liberación de glutamato con PDBu a  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  de 0,1 mM es similar a la obtenida en ausencia de PDBu a  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  más elevado (0,5 mM) (fig. IV. 34), indicando que, en los botones con canales P/Q, el calcio enmascara la potenciación mediada por PDBu. En este sentido, se ha descrito que los ésteres de forbol y el calcio potencian la transmisión sináptica mediante mecanismos parcialmente redundantes que implican el incremento del tamaño de la población de vesículas preparadas para la liberación (RRP) (Rosenmund y cols., 2002).

Las diferencias en la dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  de la potenciación por PDBu en botones con canales N ó canales P/Q podrían reflejar distintas isoformas de PLC en los dos tipos de botones con diferencias en su activación por  $\text{Ca}^{2+}$ . Si los botones sinápticos con canales P/Q tuvieran isoformas de PLC más sensibles al

$\text{Ca}^{2+}$ , la producción tónica de DAG y la activación correspondiente de Munc 13 ocluirían los efectos de los ésteres de forbol, que sólo pondrían de manifiesto con concentraciones bajas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

En el otro extremo se encuentran las terminaciones con canales de calcio de tipo N, donde las altas concentraciones de calcio extracelular no enmascaran la potenciación de la liberación que induce PDBu. Desconocemos la causa de estas diferencias entre los sitios de liberación que contienen canales de calcio de tipo N o P/Q. Ya se ha comentado que, en algunas sinapsis los canales N y P/Q presentan diferente eficiencia en el control de la exocitosis (Wu y cols., 1999; Ahmed y Siegelbaum, 2009) y que, en las terminaciones nerviosas de la corteza cerebral, la liberación de glutamato acoplada a canales N es más sensible a la reducción de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  (Millán y cols., 2003) (fig. IV. 17) y a los quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (fig. IV. 2) que la liberación acoplada a los canales P/Q. Sin embargo, esto no explica el efecto diferencial de los forboles en los botones con canales N o P/Q, ya que la potenciación tiene lugar en presencia del ionóforo inomicina y, por tanto, es un fenómeno independiente de la actividad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por tanto, para explicar la diferente dependencia de la potenciación por ésteres de forbol en los botones sinápticos con canales N o P/Q debemos atender a posibles diferencias en otros componentes de la maquinaria exocitótica.

## **VI. CONCLUSIONES**

- 1.- mGluR7 inhibe la liberación de glutamato mediada por canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q por un mecanismo limitado a membrana dependiente de proteínas Gi/o, pero independiente de PLC y PKC. mGluR7 también reduce los niveles de AMPc contrarrestando así la facilitación de la liberación por PKA.
- 2.- mGluR7 inhibe la liberación de glutamato tanto en botones sinápticos con canales N como P/Q, pero siempre en presencia de los receptores GABA<sub>B</sub> y adenosina A<sub>1</sub>.
- 3.- Los botones sinápticos que expresan canales N y los que expresan canales P/Q exhiben diferentes propiedades de liberación de glutamato. Los canales N están acoplados de forma menos eficiente a la liberación y presentan una mayor inhibición por receptores acoplados a proteínas G que los canales P/Q.
- 4.- mGluR7 activa PLC, transloca Munc 13-1 y potencia la liberación de glutamato. Esta respuesta facilitadora permite al receptor ejercer un control bidireccional sobre la liberación de glutamato que puede ser relevante en la homeostasis sináptica.
- 5.- La potenciación de la liberación de glutamato que median mGluR7 y los ésteres de forbol comparten la vía de señalización intracelular y se ocluyen entre sí. Sin embargo, sólo los ésteres de forbol potencian la liberación de glutamato en botones con canales P/Q, eso sí, sólo en condiciones de bajo calcio extracelular.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

- Abe T., Sugihara H., Nawa H., Shigemoto R., Mizuno N. and Nakanishi S. (1992). Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/ $\text{Ca}^{2+}$  signal transduction. *J. Biol. Chem.* **267**, 13361-13368.
- Acher F.C., Tellier F.J., Azerad R., Brabet I.N., Fagni L., and Pin J.P. (1997). Synthesis and pharmacological characterization of aminocyclopentanetricarboxylic acids: new tools to discriminate between metabotropic glutamate receptor subtypes. *Journal of medicinal chemistry*. **40**, 3119-3129.
- Acher F.C. and Bertrand H.O. (2005). Amino acid recognition by Venus flytrap domains is encoded in an 8-residue motif. *Biopolymers* **80**(2-3), 357-66
- Agler H.L., Evans J., Tay L.H., Anderson M.J., Colecraft HM, and Yue DT (2005). G protein-gated inhibitory module of N-type (Cav2.2)  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Neuron* **46**,891-904
- Ahmed M.S. and Siegelbaum S.A. (2009). Recruitment of N-Type  $\text{Ca}^{2+}$  channels during LTP enhances low release efficacy of hippocampal CA1 perforant path synapses. *Neuron*. **63**(3), 372-85.
- Aiba A., Kano M., Chen C., Stanton M.E., Fox G.D., Herrup K., Zwingman T.A. and Tonegawa S. (1994). Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. *Cell* **79**, 377-388.
- Airas, JM., Betz, H. and El Far, O. (2001). PKC phosphorylation of a conserved serine residue in the C terminus of group III metabotropic glutamate receptors inhibits calmodulin binding. *FEBS Lett.* **494**, 60-63.
- Akazawa C, Ohishi H, Nakajima Y, Okamoto N, Shigemoto R, Nakanishi S and Mizuno N (1994). Expression of mRNAs of L-AP4-sensitive metabotropic glutamate receptors (mGluR4, mGluR6, mGluR7) in the rat retina. *Neurosci Lett* **171**, 52-54
- Akbar M., Okajima F., Tomura H., Shimegi S. and Kondo Y. (1994). A single species of A1 adenosine receptor expressed in Chinese hamster ovary cells not only inhibits cAMP accumulation but also stimulates phospholipase C and arachidonate release. *Molecular pharmacology* **45**, 1036-1042.
- Allen V., Swigart P., Cheung R., Cockcroft S. and Katan M.(1997) Regulation of inositol lipid-specific phospholipase C-delta by changes in  $\text{Ca}^{2+}$  ion concentrations. *Biochem J* **327**, 545-552.
- Ambrosio, A.F., Malva, J.O., Carvalho, A.P., and Carvalho, C.M. (1997). Inhibition of N-/P/Q- and other types of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in rat hippocampal nerve terminals by the adenosine A1 receptor. *European journal of pharmacology* **340**, 301-310
- Andrews-Zwilling Y.S., Kawabe H., Reim K., Varoqueaux F. and Brose, N. (2006). Binding to Rab3A-interacting molecule RIM regulates the presynaptic recruitment of Munc13-1 and ubMunc13-2. *J. Biol. Chem.* **281**, 19720-19731.
- Anwyl R. (1999). Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res. Rev.* **29**(1), 83-120
- Aramori I and Nakanishi S. (1992). Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron*. **8**(4), 757-65.
- Arikkath J and Campbell KP (2003) Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 298-307.
- Armstrong N and Gouaux E. (2000). Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron*. **28**(1), 165-81
- Arnot, M.I., Stotz, S.C., Jarvis, S.E., and Zamponi, G.W. (2000). Differential modulation of N-type 1B and P/Q-type 1A calcium channels by different G protein subunit isoforms. *The Journal of physiology*. **527**, 203-212.

- Arnth-Jensen, N., Jabaudon, D., and Scanziani, M. (2002). Cooperation between independent hippocampal synapses is controlled by glutamate uptake. *Nature neuroscience*. **5**, 325-331.
- Ashery, U., Varoqueaux, F., Voets, T., Betz, A., Thatur, P., Koch, H., Neher, E., Brose, N. and Rettig, J. (2000). Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *EMBO J*. **19**, 3586-3596.
- Atack J.R., Broughton H.B. and Pollack S.J. (1995). Structure and mechanism of inositol monophosphatase. *FEBS Lett*. **361**, 1-7.
- Augustine I, Rosenmund C, Südhof TC and Brose N (1999). Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature*. **400**, 457-461.
- Ayala JE, Niswender CM, Luo Q, Banko JL and Conn PJ. (2008). Group III mGluR regulation of synaptic transmission at the SC-CA1 synapse is developmentally regulated. *Neuropharmacology*. **54**(5), 804-14.
- Balschun D. and Wetzell W. (2002). Inhibition of mGluR5 blocks hippocampal LTP in vivo and spatial learning in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav*. **73**, 375-380
- Barbour B., Keller B.U., Llano I., and Marty A. (1994). Prolonged presence of glutamate during excitatory synaptic transmission to cerebellar Purkinje cells. *Neuron*. **12**, 1331-1343.
- Barclay J, Balaguero N, Mione M, Ackerman SL, Letts VA, Brodbeck J, Canti C, Meir A, Page KM and Kusumi K. (2001) Ducky mouse phenotype of epilepsy and ataxia is associated with mutations in the *Cacna2d2* gene and decreased calcium channel current in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci*. **21**, 6095-6104.
- Barclay J.W., Craig T.J., Fisher R.J., Ciufo L.F., Evans G.J., Morgan A., and Burgoyne R.D. (2003). Phosphorylation of Munc18 by protein kinase C regulates the kinetics of exocytosis. *The Journal of biological chemistry*. **278**, 10538-10545.
- Barrie, A.P., Nicholls, D.G., Sánchez-Prieto, J. and Sihra, T.S. (1991). An ion channel locus for the protein kinase C potentiation of transmitter glutamate release from guinea pig cerebrocortical synaptosomes. *J. Neurochem*. **57**, 1398-1404.
- Barrie, A.P., and Nicholls, D.G. (1993). Adenosine A1 receptor inhibition of glutamate exocytosis and protein kinase C-mediated decoupling. *Journal of neurochemistry*. **60**, 1081-1086.
- Baskys, A. and Malenka, R.C. (1991). Agonists at metabotropic glutamate receptors presynaptically inhibit EPSCs in neonatal rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)*. **444**, 687-701
- Basu J, Shen N, Dulubova I, Lu J, Guan R, Guryev O, Grishin NV, Rosenmund C and Rizo J. A minimal domain responsible for Munc13 activity. (2005). *Nat Struct Mol Biol*. **12**(11), 1017-8.
- Basu J, Betz A, Brose N and Rosenmund C. (2007). Munc13-1 C1 domain activation lowers the energy barrier for synaptic vesicle fusion. *J Neurosci*. **27**(5), 1200-10.
- Baude A, Nusser Z, Roberts JD, Mulvihill E, McIlhinney RA, Somogyi P (1993) The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 $\alpha$ ) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron*. **11**, 771-787
- Bauer C.S., Woolley R.J., Teschemacher A.G. and Seward E.P. (2007). Potentiation of exocytosis by phospholipase C-coupled G-protein-coupled receptors requires the priming protein Munc13-1. *J. Neurosci*. **27**, 212-219.
- Bean, B. (1989). More than a Ca<sup>2+</sup> channel? *Trends in neurosciences*. **12**, 128-130.

- Benítez R., Fernandez-Capetillo O., Lazaro E., Mateos J.M., Osorio A., Elezgarai I., Bilbao A., Lingenhoehl K., Van Der Putten H., Hampson D.R., Kuhn R., Knopfel T. and Grandes P. (2000). Immunocytochemical localization of the metabotropic glutamate receptor mGluR4a in the piriform cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* **417**, 263-274.
- Bergsman J.B., and Tsien R.W. (2000). Syntaxin modulation of calcium channels in cortical synaptosomes as revealed by botulinum toxin C1. *The Journal of Neuroscience.* **20**, 4368-4378.
- Berridge M.J., Downes C.P. and Hanley M.R. (1982). Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands. *Biochem. J.* **206**, 587-595.
- Bertaso F, Lill Y, Airas JM, Espeut J, Blahos J, Bockaert J, Fagni L, Betz H and El-Far O. (2006). MacMARCKS interacts with the metabotropic glutamate receptor type 7 and modulates Gprotein-mediated constitutive inhibition of calcium channels. *J. Neurochem.* **99**(1), 288-98
- Bertaso F, Zhang C, Scheschonka A, de Bock F, Fontanaud P, Marin P, Huganir RL, Betz H, Bockaert J, Fagni L and Lerner-Natoli M. (2008). PICK1 uncoupling from mGluR7a causes absence-like seizures. *Nat. Neurosci.* **11**(8), 940-48
- Bessis AS, Rondard P, Gaven F, Brabet I, Triballeau N, Prezeau L, Acher F and Pin JP. (2002). Closure of the Venus flytrap module of mGlu8 receptor and the activation process: insights from mutations converting antagonists into agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**(17), 11097-102
- Betz A, Okamoto M, Benseler F and Brose N. (1997). Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *J Biol Chem.* **272**(4), 2520-6
- Betz A, Ashery U, Rickmann M, Augustin U, Neher E, Südhof TC, Rettig J and Brose N (1998). Munc-13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitters release. *Neuron.* **21**, 123-136.
- Betz A, Thakur P, Junge HJ, Ashery U, Rhee JS, Scheuss V, Rosenmund C, Rettig J and Brose N. (2001). Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming. *Neuron.* **30**(1), 183-96
- Beuckmann, C.T., Sinton, C.M., Miyamoto, N., Ino, M. and Yanagisawa, M. (2003). N-type calcium channel  $\alpha 1B$  subunit (Cav2.2) knock-out mice display hyperactivity and vigilance state differences. *J. Neurosci.* **23**, 6793-6797.
- Bezprozvanny I., Scheller R.H. and Tsien, R.W. (1995). Functional impact of syntaxin on gating of N-type and Q-type calcium channels. *Nature.* **378**, 623-626.
- Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y, and De Waard M (2000a) The I-II loop of the  $Ca_2^+$  channel  $\alpha_1$  subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the  $\beta$  subunit. *Neuron* **25**, 177-190.
- Bichet D, Lecomte C, Sabatier JM, Felix R, and De Waard M (2000b) Reversibility of the  $Ca_2^+$  channel  $\alpha_1$ -subunit interaction. *Biochem Biophys Res Commun* **277**, 729-735.
- Biermann B, Ivankova-Susankova K, Bradaia A, Abdel Aziz S, Besseyrias V, Kapfhammer JP, Missler M, Gassmann M and Bettler B. (2010). The Sushi domains of GABAB receptors function as axonal targeting signals. *J Neurosci.* **30**(4), 1385-94
- Black JL 3rd (2003) The voltage-gated calcium channel  $\alpha$  subunits: a review of the literature. *J Bioenerg Biomembr* **35**, 649-660.
- Blackmer, T., Larsen, E.C., Bartleson, C., Kowalchyk, J.A., Yoon, E-J., Preinerger, A.M., Alford, S., Hamm, H.E. and Martin, T.F.J. (2005). G protein betagamma directly regulates SNARE protein fusion machinery for secretory granule exocytosis. *Nat. Neurosci.* **8**, 421-434.

- Blaustein M.P., Barstschat D.K., Benishin C.G., Brown W.E., Colby K.A., Krueger B.K., Schneider M.J. and Sorensen R.C. (1988). Potassium channels in rat brain synaptosomes. *Pharmacology and Toxicology. Cellular and molecular basis of synaptic transmission*. **Nato ASI Series, H21**, 241-260.
- Blein, S., Gingham, R., Uhrin, D., Smith, B.O., Soares, D.C., Veltel, S., McIlhinney, R.A., White, J.H., and Barlow, P.N. (2004). Structural analysis of the complement control protein (CCP) modules of GABA(B) receptor 1a: only one of the two CCP modules is compactly folded. *The Journal of biological chemistry*. **279**, 48292-48306
- Bonanno G. and Raiteri M. (1992). Functional evidence for multiple gamma-aminobutyric acidB receptor subtypes in the rat cerebral cortex. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **262**, 114-118.
- Bockaert J. Y Pin J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*. **18**, 1723-1729.
- Borea, P.A., Varani, K., Dalpiaz, A., Capuzzo, A., Fabbri, E., and AP, I.J. (1994). Full and partial agonistic behaviour and thermodynamic binding parameters of adenosine A1 receptor ligands. *European journal of pharmacology*. **267**, 55-61.
- Borst JG, Helmchen F and Sakmann B. (1995). Pre- and postsynaptic whole-cell recordings in the medial nucleus of the trapezoid body of the rat. *J Physiol*. **489**, 825-40
- Boudin, H., Doan, A., Xia, J., Shigemoto, R., Huganir, R.L., Worley, P. and Craig, A.M. (2000). Presynaptic clustering of mGlu7a requires the PICK1 PDZ domain binding site. *Neuron*. **28**, 485-497.
- Boudin H and Craig AM. (2001). Molecular determinants for PICK1 synaptic aggregation and mGluR7a receptor coclustering: role of the PDZ, coiled-coil, and acidic domains. *J Biol Chem*. **276**(32), 30270-6.
- Bourinet E, Soong TW, Stea A, and Snutch TP (1996) Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:1486-1491.
- Bourinet, E., Soong, T.W., Sutton, K., Slaymaker, S., Methews, E., Monteil, A., Zamponi, G.W., Nargeot, J. and Snutch, T.P. (1999). Splicing of  $\alpha 1A$  subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat. Neurosci*. **2**, 407-145.
- Bourinet E, Stotz SC, Spaetgens RL, Dayanithi G, Lemos J, Nargeot J, and Zamponi GW (2001) Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of  $\alpha 1E$  (CaV2.3) calcium channels. *Biophys J* **81**:79-88.
- Bowery, N.G., Hudson, A.L., and Price, G.W. (1987). GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* **20**, 365-383
- Bowery, N.G., Hill, D.R., Hudson, A.L., Doble, A., Middlemiss, D.N., Shaw, J., and Turnbull, M. (1980). Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature* **283**, 92-94.
- Bradford, H.F. (1995). Glutamate, GABA and epilepsy. *Progress in neurobiology* **47**, 477-511.
- Bradford, S.E. and Nadler, J.V. (2004). Aspartate release from rat hippocampal synaptosomes. *Neurosci*. **128**, 751-765.
- Bradley, S., Levey, A.I., Hersch, S.M. and Conn, J.P. (1996). Immunocytochemical localization of group III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus with subtype-specific antibodies. *J. Neurosci*. **16**, 2044-2056.
- Bradley SR, Rees HD, Yi H, Levey AI, Conn PJ (1998) Distribution and developmental regulation of metabotropic glutamate receptor 7a in rat brain. *J Neurochem*. **71**, 636-645.

- Bradley SR, Standaert DG, Rhodes KJ, Rees HD, Testa CM, Levey AI and Conn PJ (1999) Immunohistochemical localization of subtype 4a metabotropic glutamate receptors in the rat and mouse basal ganglia. *J Comp Neurol.* **407**, 33–46
- Brager, D.H., Luther, P.W., Erdelyi, F., Szabo, G., and Alger, B.E. (2003). Regulation of exocytosis from single visualized GABAergic boutons in hippocampal slices. *The Journal of Neuroscience.* **23**, 10475–10486.
- Brambilla, D., Chapman, D., and Greene, R. (2005). Adenosine mediation of presynaptic feedback inhibition of glutamate release. *Neuron.* **46**, 275–283
- Breustedt J, Gundlfinger A, Varoqueaux F, Reim K, Brose N and Schmitz D. (2010). Munc13-2 differentially affects hippocampal synaptic transmission and plasticity. *Cereb Cortex.* **20**(5), 1109–20.
- Brose N, Rosenmund C and Rettig J. (2000). Regulation of transmitter release by Unc-13 and its homologues. *Curr Opin Neurobiol.* **10**(3), 303–11.
- Brose, N. and Rosenmund, C. (2002). Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J. Cell Sci.* **115**, 4399–4411.
- Brose, N., Hofmann, K., Hata, Y. and Südhof, T.C. (1995). Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 25273–25280.
- Brown E.M., Gamba G., Riccardi D., Lombardi M., Butters R., Kifor O., Sun A., Hediger M.A., Lytton J. and Hebert S.C. (1993). Cloning and characterization of an extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **366**, 575–580.
- Brown E.M. y McLeod R.J. (2001). Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol. Rev.* **81**, 239–297.
- Bruno V., Copani A., Bonanno L., Knoepfel T., Kuhn R., Roberts P.J. and Nicoletti F. (1996). Activation of group III metabotropic glutamate receptors is neuroprotective in cortical cultures. *Eur. J. Pharmacol.* **310**, 61–66.
- Cai Z., Saugstad J.A., Sorensen S.D., Ciombor K.J., Zhang C., Schaffhauser H., Hubalek F., Pohl J., Duvoisin R.M. and Conn P.J. (2001). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates group III metabotropic glutamate receptors and inhibits their function as presynaptic receptors. *J. Neurochem.* **78**, 756–766.
- Callaerts-Vegh Z, Beckers T, Ball SM, Baeyens F, Callaerts PF, Cryan JF, Molnar E and D'Hooge R. (2006). Concomitant deficits in working memory and fear extinction are functionally dissociated from reduced anxiety in metabotropic glutamate receptor 7-deficient mice. *J. Neurosci.* **26**(24):6573–82
- Calò L, Bruno V, Spinsanti P, Molinari G, Korkhov V, Esposito Z, Patanè M, Melchiorri D, Freissmuth M and Nicoletti F. (2005). Interactions between ephrin-B and metabotropic glutamate 1 receptors in brain tissue and cultured neurons. *J Neurosci.* **25**(9), 2245–54
- Calver AR, Medhurst AD, Robbins MJ, Charles KJ, Evans ML, Harrison DC, Stammers M, Hughes SA, Hervieu G, Couve A, Moss SJ, Middlemiss DN and Pangalos MN (2000). The expression of GABA(B1) and GABA(B2) receptor subunits in the CNS differs from that in peripheral tissues. *Neuroscience.* **100**, 155–170
- Camps M, Hou C, Sidiropoulos D, Stock JB, Jakobs KH, and Gierschik P (1992) Stimulation of phospholipase C by guanine-nucleotide-binding protein  $\alpha$  subunits. *Eur J Biochem* **206**, 821–831.

- Canti, C., Page, K.M., Stephens, G.J., and Dolphin, A.C. (1999). Identification of residues in the N terminus of  $\alpha 1B$  critical for inhibition of the voltage-dependent calcium channel by G $\beta$   $\gamma$ . *The Journal of Neuroscience*. **19**, 6855-6864.
- Capogna, M., Gähwiler, B.H., and Thompson, S.M. (1995). Presynaptic enhancement of inhibitory synaptic transmission by protein kinases A and C in the rat hippocampus in vitro. *The Journal of Neuroscience*. **15**, 1249-1260
- Capogna, M. (2004). Distinct properties of presynaptic group II and III metabotropic glutamate receptor-mediated inhibition of perforant pathway- CA1 EPSCs. *Eur. J. Neurosci*. **19**, 2847-2858.
- Carbone, E., and Lux, H.D. (1984). A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature*. **310**, 501-502.
- Cartmell, J., and Schoepp, D.D. (2000). Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *Journal of neurochemistry*. **75**, 889-907.
- Castillo, P.E., Schoch, S., Schmitz, F., Sudhof, T.C. and Malenka, R.C. (2002). RIM1 $\alpha$  is required for presynaptic long-term potentiation. *Nature*. **415**, 327-330.
- Castro, A., Aguilar, J., Elias, D., Felix, R., and Delgado-Lezama, R. (2007). G-protein-coupled GABAB receptors inhibit Ca $^{2+}$  channels and modulate transmitter release in descending turtle spinal cord terminal synapsing motoneurons. *The Journal of comparative neurology*. **503**, 642-654
- Catterall W.A.(1993). Structure and modulation of Na $^{+}$  and Ca $^{2+}$  channels. *Ann NY Acad Sci*. **707**,1-19.
- Catterall, W.A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca $^{2+}$  channels. *Annual review of cell and developmental biology*. **16**, 521-555.
- Chapman, A.G. (1998). Glutamate receptors in epilepsy. *Progress in brain research* **116**, 371-383
- Chapman, A.G., Yip, P.K., Yap, J.S., Quinn, L.P., Tang, E., Harris, J.R., and Meldrum, B.S. (1999). Anticonvulsant actions of LY 367385 ((+)-2-methyl-4-carboxyphenylglycine) and AIDA ((RS)-1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid). *European journal of pharmacology*. **368**, 17-24.
- Chapman, A.G., Talebi, A., Yip, P.K., and Meldrum, B.S. (2001). Anticonvulsant activity of a mGlu(4 $\alpha$ ) receptor selective agonist, (1S,3R,4S)-1-aminocyclopentane-1,2,4-tricarboxylic acid. *European journal of pharmacology*. **424**, 107-113.
- Charvin, N., L'Eveque, C., Walker, D., Berton, F., Raymond, C., Kataoka, M., Shoji-Kasai, Y., Takahashi, M., De Waard, M., and Seagar, M.J. (1997). Direct interaction of the calcium sensor protein synaptotagmin I with a cytoplasmic domain of the  $\alpha 1A$  subunit of the P/Q-type calcium channel. *The EMBO Journal*. **16**, 4591-4596.
- Chaudhari N, Landin AM, Roper SD. 2000. A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nat. Neurosci*. **3**(2), 113-19
- Chavis P., Fagni L., Bockaert J. y Lansman J.B. (1995). Modulation of calcium channels by metabotropic glutamate receptors in cerebellar granule cells. *Neuropharmacol*. **34**, 929-937
- Chen, G., and van den Pol, A.N. (1998). Presynaptic GABAB autoreceptor modulation of P/Q-type calcium channels and GABA release in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *The Journal of Neuroscience*. **18**, 1913-1922.
- Chen YH, Li MH, Zhang Y, He LL, Yamada Y, Fitzmaurice A, Shen Y, Zhang H, Tong L, and Yang J (2004) Structural basis of the  $\alpha 1$ - subunit interaction of voltagegated Ca $^{2+}$  channels. *Nature (Lond)* **429**:675-680.
- Chen, X., and Johnston, D. (2005). Constitutively active G-protein-gated inwardly rectifying K $^{+}$  channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience*. **25**, 3787-3792.

- Chen, R.S., Deng, T.C., Garcia, T., Sellers, Z.M., and Best, P.M. (2007). Calcium channel gamma subunits: a functionally diverse protein family. *Cell biochemistry and biophysics*. **47**, 178-186
- Chien AJ, Zhao X, Shirokov RE, Puri TS, Chang CF, Sun D, Rios E, and Hosey MM (1995) Roles of a membrane-localized  $\gamma$  subunit in the formation and targeting of functional L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J Biol Chem* **270**, 30036–30044.
- Choi S. y Lovinger D.M. (1996). Metabotropic glutamate receptor modulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels involves multiple receptor subtypes in cortical neurons. *J. Neurosci*. **16**, 36-45.
- Chu, D.C., Albin, R.L., Young, A.B., and Penney, J.B. (1990). Distribution and kinetics of GABAB binding sites in rat central nervous system: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience*. **34**, 341-357
- Cochilla A.J. y Alford S. (1998). Metabotropic glutamate receptor-mediated control of neurotransmitter release. *Neuron*. **20**, 1007-1016.
- Cockcroft, S. (2006). The latest phospholipase C,  $\text{PLC}\eta$ , is implicated in neuronal function. *Trends in Biochemical. Sci*. **31**, 4-7.
- Coffey, E.T., Sihra, T.S., and Nicholls, D.G. (1993). Protein kinase C and the regulation of glutamate exocytosis from cerebrocortical synaptosomes. *The Journal of biological chemistry*. **268**, 21060-21065.
- Coffey, E.T., Herrero, I., Sihra, T.S., Sánchez-Prieto, J., and Nicholls, D.G. (1994). Glutamate exocytosis and MARCKS phosphorylation are enhanced by a metabotropic glutamate receptor coupled to a protein kinase C synergistically activated by diacylglycerol and arachidonic acid. *Journal of neurochemistry*. **63**, 1303-1310
- Colecraft, H.M., Patil, P. G. and Yue D.T. (2000). Differential occurrence of reluctant openings in G-protein-inhibited N- and P/Q-type calcium channels. *J. Gen. Physiol*. **115**, 175–192.
- Condliffe S, Corradini I, Pozzi D, Verderio C and Matteoli M. (2010). Endogenous SNAP-25 regulates native voltage-gated calcium channels in glutamatergic neurons. *J Biol Chem*. **2010 Jun 3**. [Publicación electrónica].
- Conn, P.J. and Pin, J.P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. **37**, 205–237.
- Corti C, Restituito S, Rimland JM, Brabet I, Corsi M, Pin JP and Ferraguti F (1998). Cloning and characterization of alternative mRNA forms for the rat metabotropic glutamate receptors mGluR7 and mGluR8. *Eur J Neurosci*. **10**, 3629–3641
- Corti C, Aldegheri L, Somogyi P and Ferraguti F (2002) Distribution and synaptic localisation of the metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4) in the rodent CNS. *Neuroscience*. **110**, 403–420
- Corti C, Battaglia G, Molinaro G, Rizzo B, Pittaluga A, Corsi M, Mugnaini M, Nicoletti F and Bruno V. (2007). The use of knock-out mice unravels distinct roles for mGlu2 and mGlu3 metabotropic glutamate receptors in mechanisms of neurodegeneration/ neuroprotection. *J. Neurosci*. **27**(31), 8297–308
- Couve, A., Filippov, A.K., Connolly, C.N., Bettler, B., Brown, D.A., and Moss, S.J. (1998). Intracellular retention of recombinant GABAB receptors. *The Journal of biological chemistry*. **273**, 26361-26367
- Couve A., Moss S.J. and Pangalos M.N. (2000). GABA<sub>B</sub> receptors: a new paradigm in G protein signaling. *Mol. Cell Neurosci*. **16**, 296-312.
- Craig, T.J., Evans, G.J., and Morgan, A. (2003). Physiological regulation of Munc18/nSec1 phosphorylation on serine-313. *Journal of neurochemistry*. **86**, 1450-1457
- Currie, K.P. and Fox, A.P. (1997). Comparison of N- and P/Q-type voltage-gated calcium channel current inhibition. *J. Neurosci*. **17**, 4570–4579.



- Curtis, B.M., and Catterall, W.A. (1984). Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry*. **23**, 2113-2118.
- Curtis, B.M., and Catterall, W.A. (1985). Phosphorylation of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel by cAMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **82**, 2528-2532.
- Dale, L.B., Bhattacharya, M., Seachrist, J.L., Anborgh, P.H. and Ferguson, S.S. (2001). Agonist-stimulated and tonic internalization of metabotropic glutamate receptor 1a in human embryonic kidney 293 cells: agonist-stimulated endocytosis is beta-arrestin1 isoform-specific. *Mol. Pharmacol.* **60**, 1243-1253.
- Dalezios, Y., Luján, R., Shigemoto, R., Roberts, J.D., and Somogyi, P. (2002). Enrichment of mGluR7a in the presynaptic active zones of GABAergic and non-GABAergic terminals on interneurons in the rat somatosensory cortex. *Cerebral Cortex*. **12**, 961-974
- Daly, J. W., Padgett, W. and Seamon, K. B. (1982). Activation of cyclic AMP-generating systems in brain membranes and slices by the diterpene forskolin: augmentation of receptor-mediated responses. *J. Neurochem.* **38**, 532-44.
- Daval, J.L., and Nicolas, F. (1994). Opposite effects of cyclohexyladenosine and theophylline on hypoxic damage in cultured neurons. *Neuroscience letters*. **175**, 114-116.
- Davies, C.H., Starkey, S.J., Pozza, M.F., and Collingridge, G.L. (1991). GABA autoreceptors regulate the induction of LTP. *Nature*. **349**, 609-611.
- Davies, C.H., and Collingridge, G.L. (1996). Regulation of EPSPs by the synaptic activation of GABAB autoreceptors in rat hippocampus. *The Journal of physiology*. **496**, 451-470
- Davies, A., Hendrich, J., Van Minh, A.T., Wratten, J., Douglas, L., and Dolphin, A.C. (2007). Functional biology of the alpha(2)delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends in pharmacological sciences*. **28**, 220-228
- De Blasi A., Conn P.J., Pin J. y Nicoletti F. (2001). Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor signaling. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 114-120.
- Degtiar, V.E., Scheller, R.H., and Tsien, R.W. (2000). Syntaxin modulation of slow inactivation of N-type calcium channels. *The Journal of Neuroscience*. **20**, 4355-4367.
- Deguchi-Tawarada M, Inoue E, Takao-Rikitsu E, Inoue M, Ohtsuka T and Takai Y. (2004). CAST2: identification and characterization of a protein structurally related to the presynaptic cytomatrix protein CAST. *Genes Cells*. **9**(1), 15-23
- De Jongh KS, Warner C, and Catterall WA (1990) Subunits of purified calcium channels:  $\alpha_2$  and  $\beta$  are encoded by the same gene. *J Biol Chem* **265**:14738-14741.
- De Sarro G., Chimirri A. y Meldrum B.S. (2002). Group III mGlu receptor agonists potentiate the anticonvulsant effect of AMPA and NMDA receptor block. *Eur. J. Pharmacol.* **451**, 55-61.
- de Sevilla DF, Cabezas C, de Prada AN, Sanchez-Jimenez A, and Buno W (2002). Selective muscarinic regulation of functional glutamatergic Schaffer collateral synapses in rat CA1 pyramidal neurons. *J Physiol (Lond)* **545** (Pt 1):51-63.
- Dev K.K., Nakajima Y., Kitano J., Braithwaite S.P., Henley J.M. and Nakanishi S. (2000). PICK1 interacts with and regulates PKC phosphorylation of mGluR7. *J. Neurosci.* **20**, 7252-7257.
- Dev K.K., Nakanishi S. y Henley J.M. (2001). Regulation of mGluR7 receptors by proteins that interact with the intracellular C-terminus. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 355-361.

- de Vries, K.J., Geijtenbeek, A., Brian, E.C., de Graan, P.N., Ghijsen, W.E., and Verhage, M. (2000). Dynamics of munc18-1 phosphorylation/dephosphorylation in rat brain nerve terminals. *The European journal of neuroscience*. **12**, 385-390.
- De Waard, M., Liu, H., Walker, D., Scott, V.E.S., Gurnett, C.A. and Campbell, K.P. (1997). Direct binding of G-protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature*. **385**, 446-450.
- Dimova K, Kawabe H, Betz A, Brose N and Jahn O. (2006). Characterization of the Munc13-calmodulin interaction by photoaffinity labeling. *Biochim Biophys Acta*. **1763(11)**,1256-65.
- Dimova K, Kalkhof S, Pottratz I, Ihling C, Rodriguez-Castaneda F, Liepold T, Griesinger C, Brose N, Sinz A, and Jahn O. (2009). Structural insights into the calmodulin-Munc13 interaction obtained by cross-linking and mass spectrometry. *Biochemistry*. **48(25)**,5908-21
- Dittman, J.S., and Regehr, W.G. (1996). Contributions of calcium-dependent and calcium-independent mechanisms to presynaptic inhibition at a cerebellar synapse. *The Journal of Neuroscience*. **16**, 1623-1633.
- D’Mello S. R., Borodezt K. and Soltoff S. P. (1997) Insulin-like growth factor and potassium depolarisation maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI3-kinase in IGF-1 signaling. *J. Neurosci*. **17**, 1548-1560.
- Doherty, A.J., Coutinho, V., Collingridge, G.L. and Henley, J.M. (1999). Rapid internalization and surface expression of a functional, fluorescently tagged G-protein-coupled glutamate receptor. *Biochem. J*. **341**, 415-422.
- Dolphin AC and Archer ER. (1983). An adenosine agonist inhibits and a cyclic AMP analogue enhances the release of glutamate but not GABA from slices of rat dentate gyrus. *Neurosci Lett*. **43(1)**, 49-54
- Dolphin, A.C. (1995). The G.L. Brown Prize Lecture. Voltage-dependent calcium channels and their modulation by neurotransmitters and G proteins. *Experimental physiology*. **80**, 1-36.
- Dolphin AC (2003) \_ subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr*. **35**, 599-620.
- Drake, C.T., Bausch, S.B., Milner, T.A., and Chavkin, C. (1997). GIRK1 immunoreactivity is present predominantly in dendrites, dendritic spines, and somata in the CA1 region of the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**, 1007-1012.
- Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Sudhof, T.C., and Rizo, J. (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *The EMBO Journal*. **18**, 4372-4382
- Dunkley, P.R., Jarvie, P.E., Heath, J.W., Kidd, G.J.E. and Rostas, J.A.P. (1986). Rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients. *Brain Res*. **372**, 115-129.
- Dunwiddie, T.V., and Fredholm, B.B. (1989). Adenosine A1 receptors inhibit adenylate cyclase activity and neurotransmitter release and hyperpolarize pyramidal neurons in rat hippocampus. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. **249**, 31-37.
- Dunwiddie, T.V., and Masino, S.A. (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annual review of neuroscience*. **24**, 31-55
- Durand D, Caruso C, Carniglia L and Lasaga M.(2010). Metabotropic glutamate receptor 3 activation prevents nitric oxide-induced death in cultured rat astrocytes. *J Neurochem*.**112(2)**, 420-33

- Dutar, P., and Nicoll, R.A. (1988). A physiological role for GABAB receptors in the central nervous system. *Nature*. **332**, 156-158
- Duvoisin R.M., Zhang C. y Ramonell K. (1995). A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *J. Neurosci*. **4**, 3075-3083.
- Eaton, M.J., Plunkett, J.A., Martinez, M.A., Lopez, T., Karmally, S., Cejas, P., and Whittemore, S.R. (1999). Transplants of neuronal cells bioengineered to synthesize GABA alleviate chronic neuropathic pain. *Cell transplantation*. **8**, 87-101.
- Eder, M., Becker, K., Rammes, G., Schierloh, A., Azad, S.C., Zieglgansberger, W., and Dodt, H.U. (2003). Distribution and properties of functional postsynaptic kainate receptors on neocortical layer V pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience*. **23**, 6660-6670.
- El Far O., Airas J., Wischmeyer E., Nehring R.B., Karschin A. y Betz H. (2000). Interaction of the C-terminal tail region of the metabotropic glutamate receptor 7 with the protein kinase C substrate PICK1. *Eur. J. Neurosci*. **12**, 4215-4221.
- Ellman GL., Courtney KD., Andres V. and Feather-Stone RM. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. **7**, 88-95
- Elmslie, K.S., Zhou, W. and Jones, S.W. (1990). LHRH and GTP- $\gamma$ -S modify calcium current activation in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron*. **5**, 75-80.
- Enz R (2002a) The actin-binding protein filamin-A interacts with the metabotropic glutamate receptor type 7. *FEBS Lett*. **514**, 184-188
- Enz R (2002b) The metabotropic glutamate receptor mGluR7b binds to the catalytic gamma-subunit of protein phosphatase 1. *J Neurochem*. **81**, 1130-1140
- Enz, R., and Croci, C. (2003). Different binding motifs in metabotropic glutamate receptor type 7b for filamin A, protein phosphatase 1C, protein interacting with protein kinase C (PICK) 1 and syntenin allow the formation of multimeric protein complexes. *The Biochemical Journal*. **372**, 183-191
- Enz, R. (2007). The trick of the tail: protein-protein interactions of metabotropic glutamate receptors. *BioEssays*. **29**, 60-73.
- Evans, M.C., Swan, J.H., and Meldrum, B.S. (1987). An adenosine analogue, 2-chloroadenosine, protects against long term development of ischaemic cell loss in the rat hippocampus. *Neuroscience letters* **83**, 287-292.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW and Catterall WA (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **25**, 533-535
- Essen LO., Perisic O., Cheung R., Katan M., and Williams RL. (1996). Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta. *Nature*. **380**, 595-602
- Fedchyshyn, M.J. and Wang, L-W. (2005). Developmental transformation of the release modality at the Calyx of Held synapse. *J. Neurosci*. **25**, 4131-4140.
- Fedele, D.E., Li, T., Lan, J.Q., Fredholm, B.B., and Boison, D. (2006). Adenosine A1 receptors are crucial in keeping an epileptic focus localized. *Experimental neurology*. **200**, 184-190.
- Fedulova, S.A., Kostyuk, P.G., and Veselovsky, N.S. (1985). Two types of calcium channels in the somatic membrane of new-born rat dorsal root ganglion neurones. *The Journal of physiology* **359**, 431-446.

- Feldmann J, Callebaut I, Raposo G, Certain S, Bacq D, Dumont C, Lambert N, Ouachée-Chardin M, Chedeville G, Tamary H, Minard-Colin V, Vilmer E, Blanche S, Le Deist F, Fischer A and de Saint Basile G. (2003). Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell*. **115**(4), 461-73.
- Fendt M. and Schmid S. (2002). Metabotropic glutamate receptors are involved in amygdaloid plasticity. *Eur. J. Neurosci*. **15**, 1535-1541.
- Fendt M, Schmid S, Thakker DR, Jacobson LH, Yamamoto R, Mitsukawa K, Maier R, Natt F, Hüsken D, Kelly PH, McAllister KH, Hoyer D, van der Putten H, Cryan JF and Flor PJ. (2008). mGluR7 facilitates extinction of aversive memories and controls amygdala plasticity. *Mol Psychiatry*. **13**(10), 970-9.
- Ferraguti F, Cavanni P, Eistetter H, Salvagno C, Ratti E and Trist DG. (1994). Competitive antagonism by phenylglycine derivatives at type I metabotropic glutamate receptors. *Mol Cell Neurosci*. **5**(3), 269-76
- Ferraguti F, Klausberger T, Cobden P, Baude A, Roberts JD, Szucs P, Kinoshita A, Shigemoto R, Somogyi P, Dalezios Y (2005) Metabotropic glutamate receptor 8-expressing nerve terminals target subsets of GABAergic neurons in the hippocampus. *J Neurosci*. **25**, 10520-10536
- Ferraguti F and Shigemoto R. (2006). Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res*. **326**(2), 483-504
- Fitzjohn, S.M., Irving, A.J., Palmer, M.J., Harvey, J., Lodge, D., and Collingridge, G.L. (1996). Activation of group I mGluRs potentiates NMDA responses in rat hippocampal slices. *Neuroscience letters*. **203**, 211-213
- Flor PJ., Lindauer K., Puttner I., Ruegg D., Lukic S., Knöpfel T. and Kuhn R. (1995). Molecular cloning, functional expression and pharmacological characterization of the human metabotropic glutamate receptor type 2. *Eur. J. Neurosci*. **7**, 622-629.
- Flor PJ, Putten H van der, Ruegg D, Lukic S, Leonhardt T, Bence M, Sansig G, Knöpfel T, Kuhn R (1997) A novel splice variant of a metabotropic glutamate receptor, human mGluR7b. *Neuropharmacology*. **36**, 153-159
- Folbergrova J., Haugvicova R. and Mares P. (2001). Attenuation of seizures induced by homocysteic acid in immature rats by metabotropic glutamate group II and group III receptor agonists. *Brain Res*. **908**, 120-129.
- Forsythe, I.D. and Clements, J.D. (1990). Presynaptic glutamate receptors depress excitatory monosynaptic transmission between mouse hippocampal neurones. *J. Physiol. (Lond.)*. **429**, 1-16.
- Fotuhi M, Sharp AH, Glatt CE, Hwang PM, Krosigk M von, Snyder SH, Dawson TM (1993) Differential localization of phosphoinositide- linked metabotropic glutamate receptor (mGluR1) and the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in rat brain. *J Neurosci*. **13**, 2001-2012
- Francesconi A, Duvoisin RM. (2004). Divalent cations modulate the activity of metabotropic glutamate receptors. *J. Neurosci. Res*. **75**(4), 472-79
- Francis, H.W., Scott, J.C., and Manis, P.B. (2002). Protein kinase C mediates potentiation of synaptic transmission by phorbol ester at parallel fibers in the dorsal cochlear nucleus. *Brain research*. **951**, 9-22.
- Franco, R., Ciruela, F., Casado, V., Cortes, A., Canela, E.I., Mallol, J., Agnati, L.F., Ferre, S., Fuxe, K., and Lluis, C. (2005). Partners for adenosine A1 receptors. *J Mol Neurosci*. **26**, 221-232.

- Fredholm, B.B., Jonzon, B., and Lindstrom, K. (1986). Effect of adenosine receptor agonists and other compounds on cyclic AMP accumulation in forskolin-treated hippocampal slices. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. **332**, 173-178.
- Fredholm, B.B., and Dunwiddie, T.V. (1988). How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends in pharmacological sciences*. **9**, 130-134.
- Freund, S., Ungerer, M., and Lohse, M.J. (1994). A1 adenosine receptors expressed in CHO-cells couple to adenylyl cyclase and to phospholipase C. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. **350**, 49-56.
- Froestl, W., Mickel S.J. and Bittiger H. (1993). Potent GABAB agonist and antagonist. *Current Opinion in Therapeutic Patents*. **3**, 561-567
- Froestl, W., Mickel S.J., Schmutz M. and Bittiger H. (1996). Potent, orally active GABA<sub>B</sub> receptor antagonist. *Pharmacological Review Communication*. **8**, 127-133.
- Froestl, W. and Mickel S.J. (1997). Chemistry of GABA<sub>B</sub> receptor. *Farmaco*. **56**, 101-105
- Froestl, W., Mickel, S.J., Hall, R.G., von Sprecher, G., Strub, D., Baumann, P.A., Brugger, F., Gentsch, C., Jaekel, J., Olpe, H.R. *et al.* (1995). Phosphinic acid analogues of GABA. 1. New potent and selective GABAB agonists. *Journal of medicinal chemistry*. **38**, 3297-3312
- Gabellini N., Manev R.M., Candeo P., Favaron M. and Manev H. (1993). Carboxyl domain of glutamate receptor directs its coupling to metabolic pathways. *Neuroreport*. **4**, 531-534.
- Gálvez T., Parmentier M.L., Joly C., Malitschek B., Kaupmann K., Kuhn R., Bittiger H., Froestl W., Bettler B. and Pin J.P. (1999). Mutagenesis and modeling of the GABA<sub>B</sub> receptor extracellular domain support a venus flytrap mechanism for ligand binding. *J. Biol. Chem*. **274**, 13362-13369.
- Ganda C, Schwab SG, Amir N, Heriani H, Irmansyah I, Kusumawardhani A, Nasrun M, Widyawati I, Maier W and Wildenauer DB. A family-based association study of DNA sequence variants in GRM7 with schizophrenia in an Indonesian population. *Int J Neuropsychopharmacol*. **12(9)**, 1283-9.
- Gasparini, F., Bruno, V., Battaglia, G., Lukic, S., Leonhardt, T., Inderbitzin, W., Laurie, D., Sommer, B., Varney, M.A., Hess, S.D., *et al.* (1999). (R,S)-4-phosphonophenylglycine, a potent and selective group III metabotropic glutamate receptor agonist, is anticonvulsive and neuroprotective in vivo. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. **289**, 1678-1687
- Gahwiler, B.H., and Brown, D.A. (1985). GABAB-receptor-activated K<sup>+</sup> current in voltage-clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **82**, 1558-1562
- Glaum S.R. and Miller R.J. (1995). Presynaptic metabotropic glutamate receptors modulate omega-conotoxin-GVIA-insensitive calcium channels in the rat medulla. *J. Neurophysiol*. **88**, 1512-1522.
- Gao BN and Gilman AG (1991) Cloning and expression of a widely distributed (type IV) adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:10178-10182.
- Gerber, U., Greene, R.W., Haas, H.L., and Stevens, D.R. (1989). Characterization of inhibition mediated by adenosine in the hippocampus of the rat in vitro. *The Journal of physiology*. **417**, 567-578
- Gereau, I.V., R.W. and Conn, J.P. (1995). Multiple presynaptic metabotropic glutamate receptors modulate excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal area CA1. *J. Neurosci*. **15**, 6879-6889.

- Gereau R.W. and Heinemann S.F. (1998). Role of protein kinase C phosphorylation in rapid desensitization of metabotropic glutamate receptor 5. *Neuron*. **20**, 143-151
- Gerfen CR., Choi WC., Suh PG. and Rhee SG. (1988). Phospholipase C I and II brain isozymes: immunohistochemical localization in neuronal systems in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. **85**, 3208-3212
- Gerwins, P., and Fredholm, B.B. (1995). Activation of adenosine A1 and bradykinin receptors increases protein kinase C and phospholipase D activity in smooth muscle cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. **351**, 186-193
- Ghirardi, M., Braha, O., Hochner, B., Montarolo, P.G., Kandel, E.R., and Dale, N. (1992). Roles of PKA and PKC in facilitation of evoked and spontaneous transmitter release at depressed and nondepressed synapses in Aplysia sensory neurons. *Neuron*. **9**, 479-489.
- Gillis, K.D., Mossner, R., and Neher, E. (1996). Protein kinase C enhances exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable pool of secretory granules. *Neuron*. **16**, 1209-1220.
- Goddyn H, Callaerts-Vegh Z, Stroobants S, Dirikx T, Vansteenwegen D, et al. 2008. Deficits in acquisition and extinction of conditioned responses in mGluR7 knockout mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* **90**(1), 103-11
- Godino, M.C., Torres, M. and Sánchez-Prieto, J. (2005). Inhibition of N and P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by cannabinoid receptors in single cerebrocortical nerve terminals. *FEBS Lett.* **579**, 768-772.
- Godino, M.C., Torres, M. and Sánchez-Prieto, J. (2007).  $\text{CB}_1$  receptors diminish both  $\text{Ca}^{2+}$  influx and glutamate release through two different mechanisms active in distinct populations of cerebrocortical nerve terminals. *J. Neurochem.* **101**, 1471-1482.
- Goldberg M.P., M.H., Weiss J.H., Choi D.W. (1988). Adenosine reduces cortical neuronal injury induced by oxygen or glucose deprivation *in vitro*. *Neurosciences Letters*. **89**, 323-327.
- Goldman N, Chen M, Fujita T, Xu Q, Peng W, Liu W, Jensen TK, Pei Y, Wang F, Han X, Chen JF, Schnermann J, Takano T, Bekar L, Tieu K and Nedergaard M. (2010). Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. *Nat Neurosci.* **May 30**. [Publicación electrónica]
- Gomez J., Mary S., Brabet I., Parmentier M.L., Restituito S., Bockaert J. and Pin J.P. (1996). Coupling of metabotropic glutamate receptors 2 and 4 to  $\text{G}\alpha_{15}$ ,  $\text{G}\alpha_{16}$ , and chimeric  $\text{G}\alpha_{q/i}$  proteins: characterization of new antagonists. *Mol. Pharmacol.* **50**, 923-930.
- Gonçalves, M.L., Pinto, F., and Ribeiro, J.A. (1991). Effect of adenosine on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake by electrically stimulated rat brain synaptosomes. *Journal of neurochemistry*. **56**, 1769-1773.
- González-Gutiérrez, G., Miranda-Laferte, E., Neely, A., and Hidalgo, P. (2007). The Src homology 3 domain of the beta-subunit of voltage-gated calcium channels promotes endocytosis via dynamin interaction. *The Journal of Biological Chemistry*. **282**, 2156-2162.
- González-Inchauspe, C., Forsythe, I.D. and Uchitel, O.D. (2007). Changes in synaptic transmission properties due to the expression of N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels at the calyx of Held synapse of mice lacking P/Q-type calcium channels. *J. Physiol.* **584**, 835-851.
- Gorcs T.J., Penke B., Boti Z., Katarova Z. and Hamori J. (1993). Immunohistochemical visualization of a metabotropic glutamate receptor. *Neuroreport*. **4**, 283-286.
- Gornall A.C., Bardewill C.S. and David M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**, 751-766.

- Greene R.W., and Haas H.L. (1991). The electrophysiology of adenosine in the mammalian central nervous system. *Progress in neurobiology*. **36**, 329-341.
- Grobler JA and Hurley JH. (1998). Catalysis by phospholipase C delta1 requires that  $\text{Ca}^{2+}$  bind to the catalytic domain, but not the C2 domain. *Biochemistry*. **37(14)**, 5020-8
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450.
- Gubellini P., Saulle E., Centonze D., Bonsi P., Pisani A., Bernardi G., Conquet F. and Calabresi P. (2001). Selective involvement of mGlu1 receptors in corticostriatal LTD. *Neuropharmacol.* **40**, 839-846.
- Gundlfinger A, Bischofberger J, Jochenning FW, Torvinen M, Schmitz D and Breustedt J. (2007). Adenosine modulates transmission at the hippocampal mossy fibre synapse via direct inhibition of presynaptic calcium channels. *J Physiol.* **582**, 263-77
- Guo W, Wei F, Zou S, Robbins MT, Sugiy S, Ikeda T, Tu JC, Worley PF, Dubner R, Ren K (2004) Group I metabotropic glutamate receptor NMDA receptor coupling and signaling cascade mediate spinal dorsal horn NMDA receptor 2B tyrosine phosphorylation associated with inflammatory hyperalgesia. *J Neurosci* **24**, 9161-9173
- Guo, J. and Ikeda, S.I. (2005). Coupling of metabotropic glutamate receptor 8 to N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in rat sympathetic neurons. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1840-1851.
- Gutierrez, R. (2005). The dual glutamatergic-GABAergic phenotype of hippocampal granule cells. *Trends in neurosciences*. **28**, 297-303.
- Hagiwara, S., Ozawa, S., and Sand, O. (1975). Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *The Journal of general physiology*. **65**, 617-644.
- Hamid, J., Nelson, D., Soetgens, R., Dubel, S.J., Snutch, T.P. and Zamponi, G.W. (1999). Identification of an integration center for the cross-talk between protein kinase C and G proteins modulation of N type calcium channels. *J. Biol. Chem.* **274**, 6195-6202.
- Hamori J., Takacs J. and Gorcs T.J. (1996). Immunocytochemical localization of mGluR1a metabotropic glutamate receptor in inhibitory interneurons of the cerebellar cortex. *Acta Biol. Hung.* **47**, 181-194.
- Hartmann J, Blum R, Kovalchuk Y, Adelsberger H, Kuner R, Durand GM, Miyata M, Kano M, Offermanns S and Konnerth A. Distinct roles of  $\text{G}\alpha(\text{q})$  and  $\text{G}\alpha(11)$  for Purkinje cell signaling and motor behavior. *J Neurosci.* **24(22)**, 5119-30.
- Harkins, A.B., Cahill, A.L., Powers, J.F., Tischler, A.S., and Fox, A.P. (2004). Deletion of the synaptic protein interaction site of the N-type ( $\text{CaV}2.2$ ) calcium channel inhibits secretion in mouse pheochromocytoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**, 15219-15224.
- Hartwig JH and Kwiatkowski DJ (1991) Actin-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* **3**, 87-97
- Hay M. y Kunze D.L. (1994). Glutamate metabotropic receptor inhibition of voltage-gated calcium currents in visceral sensory neurons. *J. Neurophysiol.* **72**, 421-430.
- Heidinger V, Manzerra P, Wang XQ, Strasser U, Yu SP, Choi DW and Behrens MM. (2002). Metabotropic glutamate receptor 1-induced upregulation of NMDA receptor current: mediation through the Pyk2/Src-family kinase pathway in cortical neurons. *J Neurosci.* **22(13)**, 5452-61.

- Heinke B, Balzer E and Sandkühler J. (2004). Pre- and postsynaptic contributions of voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels to nociceptive transmission in rat spinal lamina I neurons. *Eur J Neurosci.* **19**(1), 103-11.
- Herlitze, S., Garcia, D.E., Mackie, K., Hille, B., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1996). Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature.* **380**, 258-262.
- Herlitze S, Hockerman GH, Scheuer T, and Catterall WA (1997) Molecular determinants of inactivation and G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel  $\alpha_1\text{A}$  subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:1512-1516.
- Herlitze, S., Zhong, H., Scheuer, T. and Catterall, W.A. (2001). Allosteric modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels by G proteins, voltage-dependent facilitation, protein kinase C, and  $\text{Ca}_v\beta$  subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 4699-4704.
- Hermans E., Nahorski S.R. y Challiss R.A. (1998). Reversible and non-competitive antagonist profile of CPCCOEt at the human type  $1\alpha$  metabotropic glutamate receptor. *Neuropharmacol.* **37**, 1645-1647.
- Herrada G. y Dulac C. (1997). A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell.* **90**, 763-773.
- Herrero, I., Castro, E., Miras-Portugal, M.T. and Sánchez-Prieto, J. (1991). Glutamate exocytosis evoked by 4-aminopyridine is inhibited by free fatty acids released from synaptosomes. *Neurosci. Lett.* **126**, 41-44.
- Herrero, I., Miras-Portugal, M.T. and Sánchez-Prieto, J. (1992a). Activation of protein kinase C by phorbol esters and arachidonic acid required for the optimal potentiation of glutamate exocytosis. *J. Neurochem.* **59**, 1574-1577.
- Herrero, I., Miras-Portugal, M.T. and Sánchez-Prieto, J. (1992b). Positive feedback of glutamate exocytosis by metabotropic presynaptic receptor stimulation. *Nature.* **360**, 163-166.
- Herrero I., Miras-Portugal M.T. and Sánchez-Prieto J. (1994). Rapid desensitization of the metabotropic glutamate receptor that facilitates glutamate release in rat cerebrocortical nerve terminals. *Eur. J. Neurosci.* **6**, 115-120
- Herrero, I., Vazquez, E., Miras-Portugal, M.T. and Sánchez-Prieto, J. (1996). A decrease in  $[\text{Ca}^{2+}]$  but not in cAMP mediates L-AP4 inhibition of glutamate release: PKC-mediated suppression of this inhibitory pathway. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 700-709.
- Herrero I., Miras-Portugal M.T. y Sánchez-Prieto J. (1998). Functional switch from facilitation to inhibition in the control of glutamate release by metabotropic glutamate receptors. *J. Biol. Chem.* **273**, 1951-1958.
- Hessler, N.A., Shirke, A.M., and Malinow, R. (1993). The probability of transmitter release at a mammalian central synapse. *Nature.* **366**, 569-572.
- Hille, B. (1994). Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends in neurosciences.* **17**, 531-536.
- Hirbec H, Perestenko O, Nishimune A, Meyer G, Nakanishi S, Henley JM, Dev KK (2002) The PDZ proteins PICK1, GRIP, and syntenin bind multiple glutamate receptor subtypes. Analysis of PDZ binding motifs. *J Biol Chem.* **277**, 15221-15224
- Hiltscher R, Seuwen K, Boddeke HW, Sommer B and Laurie DJ. (1998). Functional coupling of human metabotropic glutamate receptor hmGlu1d: comparison to splice variants hmGlu1a and -1b. *Neuropharmacology.* **37**(7), 827-37.



- Hirata, K., Ohno-Shosaku, T., Sawada, S., and Yamamoto, C. (1995). Baclofen inhibits GABAergic transmission after treatment with type-specific calcium channel blockers in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience letters*. **187**, 205-208.
- Hollins, C., and Stone, T.W. (1980). Adenosine inhibition of gamma-aminobutyric acid release from slices of rat cerebral cortex. *British journal of pharmacology*. **69**, 107-112.
- Hollmann M and Heinemann S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*. **17**, 31-108
- Holscher, C., Schmid, S., Pilz, P.K., Sansig, G., van der Putten, H., and Plappert, C.F. (2004). Lack of the metabotropic glutamate receptor subtype 7 selectively impairs short-term working memory but not long-term memory. *Behavioural brain research*. **154**, 473-481.
- Holscher, C., Schmid, S., Pilz, P.K., Sansig, G., van der Putten, H., and Plappert, C.F. (2005). Lack of the metabotropic glutamate receptor subtype 7 selectively modulates Theta rhythm and working memory. *Learning and memory Cold Spring Harbor, N.Y* **12**, 450-455.
- Homma ., Takenawa T., Emori Y., Sorimachi H., and Suzuki K. (1989).. Tissue and cell type-specific expression of mRNAs for four types of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Biochem Biophys Res Commun* **164** 406-412
- Honda, I., Kamiya, H., and Yawo, H. (2000). Re-evaluation of phorbol ester-induced potentiation of transmitter release from mossy fibre terminals of the mouse hippocampus. *The Journal of physiology*. **529**, 763-776
- Hosey, M.M., Barhanin, J., Schmid, A., Vandaele, S., Ptasienski, J., O'Callahan, C., Cooper, C., and Lazdunski, M. (1987). Photoaffinity labelling and phosphorylation of a 165 kilodalton peptide associated with dihydropyridine and phenylalkylamine-sensitive calcium channels. *Biochemical and biophysical research communications* **147**, 1137-1145.
- Hosseiniardi, N., Mirnajafi-Zadeh, J., Fathollahi, Y., and Shahabi, P. (2007). The role of adenosine A1 and A2A receptors of entorhinal cortex on piriform cortex kindled seizures in rats. *Pharmacological research* **56**, 110-117
- Houamed K.M., Kuijper J.L., Gilbert T.L., Haldeman B.A., O'Hara P.J., Mulvihill E.R., Almers W. y Hagen F. (1991). Cloning, expression and gene structure of a G-protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science* **252**, 1318-1321.
- Houeland, G., Nakhost, A., Sossin, W.S., and Castellucci, V.F. (2007). PKC modulation of transmitter release by SNAP-25 at sensory-to-motor synapses in aplysia. *Journal of neurophysiology* **97**, 134-143.
- Huang, Y.H., and Bergles, D.E. (2004). Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Current opinion in neurobiology* **14**, 346-352
- Hubert GW, Paquet M, Smith Y (2001) Differential subcellular localization of mGluR1a and mGluR5 in the rat and monkey substantia nigra. *J Neurosci*. **21**, 1838-1847
- Hurley JH, Cahill AL, Wang M, and Fox AP (2004) Syntaxin 1A regulation of weakly inactivating N-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Physiol (Lond)* **560 (Pt 2)**, 351-363.
- Hwang, J-I., Oh, Y-S., Shin, K-J., Kim, H., Ryu, S-H. and Suh P-A. (2005). Molecular cloning and characterization of a novel phospholipase C, PLC-eta. *Biochem. J*. **389**, 181-186.
- Iacovelli L, Bruno V, Salvatore L, Melchiorri D, Gradini R, Caricasole A, Barletta E, De Blasi A and Nicoletti F. (2002). Native group-III metabotropic glutamate receptors are coupled to the mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol-3-kinase pathways. *J Neurochem*. **82(2)**, 216-23

- Ichise T., Kano M., Hashimoto K., Yanagihara D., Nakao K., Shigemoto R., Katsuki M. y Aiba A. (2001). mGluR1 in cerebellar Purkinje cells essential for long-term depression, synapse elimination, and motor coordination. *Science* **288**, 1832-1835.
- Ikeda S.R., Lovinger D.M., McCool B.A. y Lewis D.L. (1995). Heterologous expression of metabotropic glutamate receptors in adult rat sympathetic neurons: subtype-specific coupling to ion channels. *Neuron* **14**, 1029-1038.
- Ikeda SR (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G  $\beta\gamma$  protein subunits. *Nature (Lond)* **380**:255-258.
- Ino, M., Yoshinaga, T., Wakamori, M., Miyamoto, N., Takahashi, E., Sonoda, J., Kagawa, T., Oki, T., Nagasu, T., Nishizawa, Y., Tanaka, I., Imoto, K., Aizawa, S., Koch, S., Schwartz, A., Niimode, T., Sawada K. and Mori, Y. (2001). Functional disorders of the sympathetic nervous system in mice lacking the  $\alpha 1B$  subunit (Cav 2.2) of N-type calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 5323-5328.
- Ipponi, A., Lamberti, C., Medica, A., Bartolini, A., and Malmberg-Aiello, P. (1999). Tiagabine antinociception in rodents depends on GABA(B) receptor activation: parallel antinociception testing and medial thalamus GABA microdialysis. *European journal of pharmacology* **368**, 205-211
- R.F. Irvine, A.J. Letcher, J.P. Heslop and M.J. Berridge. (1986). The inositol tris/tetrakisphosphate pathway: Demonstration of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3- kinase activity in animal tissues. *Nature* **320**, 631-634.
- R.F. Irvine, M.J. Schell. (2001). Back in the water: The return of the inositol phosphates. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 327-338.
- Isaacson, J.S., and Hille, B. (1997). GABA(B)-mediated presynaptic inhibition of excitatory transmission and synaptic vesicle dynamics in cultured hippocampal neurons. *Neuron* **18**, 143-152.
- Ishikawa, T., Kaneko, M., Shin, H.S., and Takahashi, T. (2005). Presynaptic N-type and P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels mediating synaptic transmission at the calyx of Held of mice. *The Journal of physiology* **568**, 199-209
- Iwasaki, S., Momiyama, A., Uchitel, O.D. and Takahashi, T. (2000). Developmental changes in calcium channels types mediating central synaptic transmission. *J. Neurosci.* **20**, 59-65.
- Jacobson, K.A., Trivedi, B.K., Churchill, P.C., and Williams, M. (1991). Novel therapeutics acting via purine receptors. *Biochemical pharmacology* **41**, 1399-1410
- Jane, D.E., Pittaway, K., Sunter, D.E., Thomas, N.K. and Watkins, J.C. (1995). New phenylglycine derivatives with potent and selective antagonist activity at presynaptic glutamate receptors in neonatal rat spinal cord. *Neuropharmacology* **34**, 851-856.
- Jarvis SE, Magga JM, Beedle AM, Braun JE, and Zamponi GW (2000) G protein modulation of N-type calcium channels is facilitated by physical interactions between syntaxin 1A and G $\alpha$ . *J Biol Chem* **275**:6388-6394.
- Jarvis SE and Zamponi GW (2001) Interactions between presynaptic Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> channels, cytoplasmic messengers and proteins of the synaptic vesicle release complex. *Trends Pharmacol Sci* **22**:519-525.
- Jarvis SE, Barr W, Feng ZP, Hamid J, and Zamponi GW (2002) Molecular determinants of syntaxin 1 modulation of N-type calcium channels. *J Biol Chem* **277**, 44399-44407.
- Jay, S.D., Ellis, S.B., McCue, A.F., Williams, M.E., Vedvick, T.S., Harpold, M.M., and Campbell, K.P. (1990). Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science (New York, N.Y)* **248**, 490-492.
- Jeon D, Kim C, Yang YM, Rhim H, Yim E, Oh U and Shin HS. (2007) Impaired long-term memory and long-term potentiation in N-type Ca<sup>2+</sup> channel-deficient mice. *Genes Brain Behav.* **6(4)**:375-88.

- Jia Z., Lu Y., Henderson J., Taverna F., Romano C., Abramow-Newerly W., Wojtowicz J.M. y Roder J. (1998). Selective abolition of the NMDA component of long-term potentiation in mice lacking mGluR5. *Learn Mem.* **5**, 331-343.
- Jingami H, Nakanishi S, Morikawa K. 2003. Structure of the metabotropic glutamate receptor. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**(3):271-78
- Jockers, R., Linder, M.E., Hohenegger, M., Nanoff, C., Bertin, B., Strosberg, A.D., Marullo, S., and Freissmuth, M. (1994). Species difference in the G protein selectivity of the human and bovine A1-adenosine receptor. *The Journal of biological chemistry* **269**, 32077-32084.
- Joly C., Gomeza J., Brabet I., Curry K., Bockaert J. y Pin J.P. (1995). Molecular, functional, and pharmacological characterization of the metabotropic glutamate receptor type 5 splice variants: comparison with mGluR1. *J. Neurosci.* **15**, 3970-3981
- Jones, K.A., Borowsky, B., Tamm, J.A., Craig, D.A., Durkin, M.M., Dai, M., Yao, W.J., Johnson, M., Gunwaldsen, C., Huang, L.Y., *et al.* (1998). GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* **396**, 674-679.
- Jones, S.W., and Elmslie, K.S. (1997). Transmitter modulation of neuronal calcium channels. *The Journal of membrane biology* **155**, 1-10
- Jovanovic, J., Czernik, A.J., Fienberg, A.A., Greengard, P. and Sihra, T.S. (2000). Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nature Neurosci.* **3**, 323-329.
- Jun, K., Piedras-Renteria, E.S., Smith, S.M., Wheeler, D.B., Lee, S.B., Lee, T.G., Chin, H., Adams, M.E., Scheller, R.H., Tsien, R.W., and Shin, H.S. (1999). Ablation of P/Q-type Ca(2+) channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the alpha(1A)-subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 15245-15250.
- Junge HJ, Rhee JS, Jahn O, Varoqueaux F, Spiess J, Waxham MN, Rosenmund C and Brose N. (2004). Calmodulin and Munc13 form a Ca<sup>2+</sup> sensor/effector complex that controls short-term synaptic plasticity. *Cell.* **118**(3):389-401
- Kalla, S., Stern, M., Basu, J., Varoqueaux, F., Reim, K., Rosenmund, C., Ziv, N.E. and Brose, N. (2006). Molecular dynamics of a presynaptic active zone protein studied in Munc13-1-enhanced yellow fluorescent protein knock-in mutant mice. *J. Neurosci.* **26**, 13054-13066.
- Kammermeier P.J. e Ikeda S.R. (1999). Expression of RGS2 alters the coupling of metabotropic glutamate receptor 1a to M-type K<sup>+</sup> and N-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* **22**, 819-829.
- Kammermeier P.J., Xiao B., Tu J.C., Worley P.F. e Ikeda S.R. (2000). Homer proteins regulate coupling of group I metabotropic glutamate receptors to N-type calcium and M-type potassium channels. *J. Neurosci.* **20**, 7238-7245.
- Kammermeier PJ and Ikeda SR. (2002). Desensitization of group I metabotropic glutamate receptors in rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol.* **87**(4):1669-76
- Kamp, T.J., and Hell, J.W. (2000). Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circulation research* **87**, 1095-1102.
- Kangrga, I., Jiang, M.C., and Randic, M. (1991). Actions of (-)-baclofen on rat dorsal horn neurons. *Brain research* **562**, 265-275.
- Kangrga, I., and Randic, M. (1991). Outflow of endogenous aspartate and glutamate from the rat spinal dorsal horn in vitro by activation of low- and high-threshold primary afferent fibers. Modulation by mu-opioids. *Brain research* **553**, 347-352.

- Kataoka M, Kuwahara R, Iwasaki S, Shoji-Kasai Y and Takahashi M. (2000). Nerve growth factor-induced phosphorylation of SNAP-25 in PC12 cells: a possible involvement in the regulation of SNAP-25 localization. *J Neurochem.* **74**(5):2058-66.
- Katona, I., Urban, G.M., Wallace, M., Ledent, C., Jung, K.M., Piomelli, D., Mackie, K. and Freund, T.F. (2006). Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J. Neurosci.* **26**, 5628-5637.
- Kauppinen R.A. y Nicholls D.G. (1986). Synaptosomal bioenergetics. The role of glycolysis, pyruvate oxidation and responses to hypoglycaemia. *Eur. J. Biochem.* **158**, 159-165.
- Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, P.J., Bischoff, S., Mickel, S.J., McMaster, G., Angst, C., Bittiger, H., Froestl, W., and Bettler, B. (1997). Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* **386**, 239-246
- Kerr, D.I., Ong, J., Prager, R.H., Gynther, B.D., and Curtis, D.R. (1987). Phaclofen: a peripheral and central baclofen antagonist. *Brain research* **405**, 150-154.
- Kerr, D.I., Ong, J., Johnston, G.A., Abbenante, J., and Prager, R.H. (1988). 2-Hydroxy-saclofen: an improved antagonist at central and peripheral GABAB receptors. *Neuroscience letters* **92**, 92-96.
- Kew J.N., Ducarre J.M., Pflimlin M.C., Mutel V. y Kemp J.A. (2001). Activity-dependent presynaptic autoinhibition by group II metabotropic glutamate receptors at the perforant path inputs to the dentate gyrus and CA1. *Neuropharmacol.* **40**, 20-27.
- Kim C, Jun K, Lee T, Kim SS, McEnery MW, Chin H, Kim HL, Park JM, Kim DK, Jung SJ, Kim J and Shin HS. (2001). Altered nociceptive response in mice deficient in the alpha(1B) subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Mol Cell Neurosci.* **18**(2),235-45
- Kim C, Jeon D, Kim YH, Lee CJ, Kim H and Shin HS.(2009) Deletion of N-type Ca(2+) channel Ca(v)2.2 results in hyperaggressive behaviors in mice. *J Biol Chem.* **284**(5):2738-45.
- Kimura, M., Saitoh, N., and Takahashi, T. (2003). Adenosine A(1) receptor-mediated presynaptic inhibition at the calyx of Held of immature rats. *The Journal of physiology* **553**, 415-426
- Kinoshita A, Ohishi H, Neki A, Nomura S, Shigemoto R, Takada M, Nakanishi S, Mizuno N (1996) Presynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR8, in the rhinencephalic areas: a light and electron microscope study in the rat. *Neurosci Lett* **207**:61-64
- Kinoshita, A., Shigemoto, R., Ohishi, H., Van Der Putten, H. and Mizuno, N. (1998). Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors, mGluR7a and mGluR7b in the central nervous system of the adult rat and mouse: a light and electron microscopy study. *J. Comp. Neurol.* **393**, 332-352.
- Kinzie, J.M., Saugstad, J.A., Westbrook, G.L. and Segerson, T.P. (1995). Distribution of metabotropic glutamate receptor 7 messenger RNA in the developing and adult rat brain. *Neuroscience* **69**, 167-176.
- Kinzie JM, Shinohara MM, Pol AN van den, Westbrook GL, Segerson TP (1997) Immunolocalization of metabotropic glutamate receptor 7 in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* **385**:372-384
- Klinger M, Freissmuth M and Nanoff C. (2002) Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cell Signal.* **14**(2):99-108.
- Klotz KN, Lohse MJ and Schwabe U. (1988). Chemical modification of A1 adenosine receptors in rat brain membranes. Evidence for histidine in different domains of the ligand binding site. *J Biol Chem.* **263**(33):17522-6

- Klugbauer N, Lacinova L, Marais E, Hobom M, and Hofmann F (1999) Molecular diversity of the calcium channel  $\alpha_2$  subunit. *J Neurosci* **19**:684–691.
- Klugbauer N, Marais E, and Hofmann F (2003) Calcium channel  $\alpha_2$  subunits: differential expression, function, and drug binding. *J Bioenerg Biomembr* **35**:639–647.
- Knight, A.R., and Bowery, N.G. (1996). The pharmacology of adenylyl cyclase modulation by GABAB receptors in rat brain slices. *Neuropharmacology* **35**, 703–712.
- Kochanek, P.M., Vagni, V.A., Janesko, K.L., Washington, C.B., Crumrine, P.K., Garman, R.H., Jenkins, L.W., Clark, R.S., Homanics, G.E., Dixon, C.E., *et al.* (2006). Adenosine A1 receptor knockout mice develop lethal status epilepticus after experimental traumatic brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* **26**, 565–575
- Kogo N, Dalezios Y, Capogna M, Ferraguti F, Shigemoto R, Somogyi P (2004) Depression of GABAergic input to identified hippocampal neurons by group III metabotropic glutamate receptors in the rat. *Eur J Neurosci* **19**:2727–2740
- Korogod, N., Lou, X., and Schneggenburger, R. (2007). Posttetanic potentiation critically depends on an enhanced  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of vesicle fusion mediated by presynaptic PKC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 15923–15928.
- Koschak A, Reimer D, Walter D, Hoda JC, Heinzle T, Grabner M, and Striessnig J (2003) Cav1.4 $\alpha_1$  subunits can form slowly inactivating dihydropyridine-sensitive L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels lacking  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inactivation. *J Neurosci* **23**:6041–6049.
- Kosinski CM, Risso Bradley S, Conn PJ, Levey AI, Landwehrmeyer GB, Penney JB Jr, Young AB, Standaert DG (1999) Localization of metabotropic glutamate receptor 7 mRNA and mGluR7a protein in the rat basal ganglia. *J Comp Neurol* **415**:266–284
- Kouchi Z, Fukami K, Shikano T, Oda S, Nakamura Y, Takenawa T and Miyazaki S. Recombinant phospholipase C $\zeta$  has high  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity and induces  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in mouse eggs. *J Biol Chem.* **279**(11):10408–12.
- Kouchi Z, Fukami K, Shikano T, Oda S, Nakamura Y, Takenawa T and Miyazaki S. (2004) Recombinant phospholipase C $\zeta$  has high  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity and induces  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in mouse eggs. *J. Biol. Chem.* **279**, 10408–10412
- Koyrakh, L., Luján, R., Colon, J., Karschin, C., Kurachi, Y., Karschin, A., and Wickman, K. (2005). Molecular and cellular diversity of neuronal G-protein-gated potassium channels. *The Journal of Neuroscience* **25**, 11468–11478.
- Krieger P, Hellgren-Kotaleski J, Kettunen P and El Manira AJ. (2000). Interaction between metabotropic and ionotropic glutamate receptors regulates neuronal network activity. *J Neurosci.* **20**(14):5382–91
- Kuang D, Yao Y, Wang M, Pattabiramann N, Kotra LP, Hampson DR. (2003). Molecular similarities in the ligand binding pockets of an odorant receptor and the metabotropic glutamate receptors. *J. Biol. Chem.* **278**(43):42551–59
- Kubo Y, Miyashita T, Murata Y. (1998). Structural basis for a  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing function of the metabotropic glutamate receptors. *Science* **279**(5357):1722–25
- Kudoh, S.N., Nagai, R., Kiyosue, K., and Taguchi, T. (2001). PKC and CaMKII dependent synaptic potentiation in cultured cerebral neurons. *Brain research* **915**, 79–87
- Kulik, A., Vida, I., Luján, R., Haas, C.A., Lopez-Bendito, G., Shigemoto, R., and Frotscher, M. (2003). Subcellular localization of metabotropic GABA(B) receptor subunits GABA(B1a/b) and GABA(B2) in the rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience* **23**, 11026–11035.

- Kulik, A., Vida, I., Fukazawa, Y., Guetg, N., Kasugai, Y., Marker, C.L., Rigato, F., Bettler, B., Wickman, K., Frotscher, M., and Shigemoto, R. (2006). Compartment-dependent colocalization of Kir3.2-containing K<sup>+</sup> channels and GABAB receptors in hippocampal pyramidal cells. *The Journal of Neuroscience* **26**.
- Kullmann, D.M., Erdemli, G., and Asztely, F. (1996). LTP of AMPA and NMDA receptor-mediated signals: evidence for presynaptic expression and extrasynaptic glutamate spill-over. *Neuron* **17**, 461-474.
- Kuner, R., Kohr, G., Grunewald, S., Eisenhardt, G., Bach, A., and Kornau, H.C. (1999). Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science (New York)*, **283**, 74-77.
- Kunishima N., Shimada Y., Tsuji Y., Sato T., Yamamoto M., Kumasaka T., Nakanishi S., Jingami H. y Morikawa K. (2000). Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* **407**, 971-977.
- Kuusinen A., Arvola M. y Keinänen K. (1995). Molecular dissection of the agonist binding site of an AMPA receptor. *EMBO J.* **14**, 6327-6332.
- Kushmerick, C., Price, G.D., Taschenberger, H., Puente, N., Renden, R., Wadiche, J.I., Duvoisin, R.M., Grandes, P. and von Gersdorff, H. (2004). Retroinhibition of presynaptic Ca<sup>2+</sup> currents by endocannabinoids released via postsynaptic mGluR activation at a calyx synapse. *J. Neurosci.* **24**, 5955-5965
- Kuwajima M, Hall RA, Aiba A, Smith Y (2004) Subcellular and subsynaptic localization of group I metabotropic glutamate receptors in the monkey subthalamic nucleus. *J Comp Neurol* **474**:589-602
- Lacey, C.J., Boyes, J., Gerlach, O., Chen, L., Magill, P.J., and Bolam, J.P. (2005). GABA(B) receptors at glutamatergic synapses in the rat striatum. *Neuroscience* **136**, 1083-1095.
- Ladera, C., Godino, M.C., Martín, R., Luján, R., Shigemoto, M., Ciruela, F., Torres, M. and Sánchez-Prieto, J. (2007). The coexistence of multiple receptors in a single nerve terminal provides evidence for presynaptic integration. *J. Neurochem.* **103**, 2314-2326.
- Ladera C, del Carmen Godino M, José Cabañero M, Torres M, Watanabe M, Luján R and Sánchez-Prieto J. (2008). Pre-synaptic GABA receptors inhibit glutamate release through GIRK channels in rat cerebral cortex. *J Neurochem.* **107**(6):1506-17
- Lafon-Cazal M., Fagni L., Guiraud M.J., Mary S., Lerner-Natoli M., Pin J.P., Shigemoto R. y Bockaert J. (1999). mGluR7-like metabotropic glutamate receptors inhibit NMDA-mediated excitotoxicity in cultured mouse cerebellar granule neurons. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 663-672
- Lan JY, Skeberdis VA, Jover T, Zheng X, Bennett MV and Zukin RS.(2001) Activation of metabotropic glutamate receptor 1 accelerates NMDA receptor trafficking. *J Neurosci.* **21**(16):6058-68.
- Lehtinen, M.J., Meri, S., and Jokiranta, T.S. (2004). Interdomain contact regions and angles between adjacent short consensus repeat domains. *Journal of molecular biology* **344**, 1385-1396.
- Lee CW., Lee KH., Park D. and Rhee SG.. (1994). Regulation of phospholipase C-beta 4 by ribonucleotides and the alpha subunit of Gq. *J Biol Chem* **269**: 25335-25338.
- Lee O., Lee C.J. y Choi S. (2002). Induction mechanisms for L-LTP at thalamic input synapses to the lateral amygdala: requirement of mGluR5 activation. *Neuroreport* **13**, 685-691.
- Lerma J., Herranz A.S., Herreras O., Abaira V. y Martín del Río R. (1986). In vivo determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis. *Brain Res.* **384**, 145-155.
- Leung, A.T., Imagawa, T., and Campbell, K.P. (1987). Structural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel from rabbit skeletal muscle. Evidence for two distinct high molecular weight subunits. *The Journal of biological chemistry* **262**, 7943-7946.

- Levenes C., Daniel H. y Crepel F. (1998). Long-term depression of synaptic transmission in the cerebellum: cellular and molecular mechanisms revisited. *Prog. Neurobiol.* **55**, 79-91.
- Li, H., Ohishi, H., Kinoshita, A., Shigemoto, R., Nomura, S. and Mizuno, N. (1997). Localization of a metabotropic receptor, mGluR7, in axon terminals of presumed nociceptive, primary afferent fibers in the superficial layers of the spinal dorsal horn: an electron microscope study in the rat. *Neurosci. Lett.* **223**, 1534-1156.
- Li B, Zhong H, Scheuer T, and Catterall WA (2004) Functional role of a C-terminal G $\alpha$ -binding domain of Cav2.2 channels. *Mol Pharmacol* **66**:761-769.
- Li XM, Li CC, Yu SS, Chen JT, Sabapathy K and Ruan DY. (2007). JNK1 contributes to metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression and short-term synaptic plasticity in the mice area hippocampal CA1. *Eur J Neurosci.* **25**(2):391-6.
- Liang, Y.C., Huang, C.C., Hsu, K.S. and Takahashi, T. (2004). Cannabinoid-induced presynaptic inhibition at the primary afferent trigeminal synapse of juvenile rat brainstem slices. *J. Physiol. (London)* **555**, 85-96.
- Lipscombe, D., Kongsamut, S., and Tsien, R.W. (1989). Alpha-adrenergic inhibition of sympathetic neurotransmitter release mediated by modulation of N-type calcium-channel gating. *Nature* **340**, 639-642.
- Llinas, R., Sugimori, M., Lin, J.W., and Cherksey, B. (1989). Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United.* **86**, 1689-1693
- J.J. Liu, D.S. Hartman and J.R. Bostwick. (2003). An immobilized metal ion affinity adsorption and scintillation proximity assay for receptorstimulated phosphoinositide hydrolysis. *Anal. Biochem.* **318**, 91-99.
- Lohse MJ, Klotz KN, Lindenborn-Fotinos J, Reddington M, Schwabe U and Olsson RA. (1987). 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX)--a selective high affinity antagonist radioligand for A1 adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **336**(2):204-10.
- Lomasney JW., Cheng HF., Roffler SR. and King K. (1999). Activation of phospholipase C delta1 through C2 domain by a Ca(21)-enzyme phosphatidylserine ternary complex. *J Biol Chem* **274**: 21995-22001, 1999.
- Lonart, G., Schoch, S., Kaeser, P.S., Larkin, C.J., Sudhof, T.C. and Linden, D.J. (2003). Phosphorylation of RIM1alpha by PKA triggers presynaptic long-term potentiation at cerebellar parallel fiber synapses. *Cell* **115**, 49-60.
- Lopez S, Turle-Lorenzo N, Acher F, De Leonibus E, Mele A, and Amalric M. (2007). Targeting group III metabotropic glutamate receptors produces complex behavioral effects in rodent models of Parkinson's disease. *J Neurosci.* **27**(25):6701-11
- Lopez-Bendito G, Shigemoto R, Fairen A, Lujan R (2002) Differential distribution of group I metabotropic glutamate receptors during rat cortical development. *Cereb Cortex* **12**:625-638
- Lopez-Bendito, G., Shigemoto, R., Kulik, A., Vida, I., Fairen, A., and Luján, R. (2004). Distribution of metabotropic GABA receptor subunits GABAB1a/b and GABAB2 in the rat hippocampus during prenatal and postnatal development. *Hippocampus* **14**, 836-848.
- Lou X, Korogod N, Brose N, Schneggenburger R (2008). Phorbol esters modulate spontaneous and Ca<sup>2+</sup>-evoked transmitter release via acting on both munc13 and protein kinase C. *J. Neurosci.* **28**, 8257-8267.



- Lu Y.M., Jia Z., Janus C., Henderson J.T., Gerlai R., Wojtowicz J.M. y Roder J.C. (1997). Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *J. Neurosci.* **17**, 5196-5205.
- Luebke, J.I., Dunlap, K. and Turner, T.J. (1993). Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron* **11**, 895-902.
- Lujan R, Nusser Z, Roberts JD, Shigemoto R, Somogyi P (1996) Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **8**:1488-1500
- Lujan R, Roberts JD, Shigemoto R, Ohishi H, Somogyi P (1997) Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 alpha, mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites. *J Chem Neuroanat* **13**:219-241
- Luján R and Shigemoto R. (2006). Localization of metabotropic GABA receptor subunits GABAB1 and GABAB2 relative to synaptic sites in the rat developing cerebellum. *Eur J Neurosci.* **23(6)**:1479-90
- Lüscher, C., Jan, L.Y., Stoffel, M., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1997). G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* **19**, 687-695.
- Lynch, J.J., 3rd, Alexander, K.M., Jarvis, M.F., and Kowaluk, E.A. (1998). Inhibition of adenosine kinase during oxygen-glucose deprivation in rat cortical neuronal cultures. *Neuroscience letters* **252**, 207-210.
- Macek, T.A., Winder, D.G., Gereau, I.V.R.W., Ladd, C.O. and Conn, P.J. (1996). Differential involvement of group II and group III mGluRs as autoreceptors at lateral and medial perforant path synapses. *J. Neurophysiol.* **76**, 3798-3806.
- Macek, T.A., Schaffhouser, H. and Conn, P.J. (1998). Protein kinase C and A3 adenosine receptor binding activation inhibit presynaptic metabotropic glutamate receptor (mGluR) function and uncouple mGluRs from GTP binding proteins. *J. Neurosci.* **18**, 6138-6146.
- Macek T.A., Schaffhauser H. y Conn P.J. (1999). Activation of PKC disrupts presynaptic inhibition by group II and group III metabotropic glutamate receptors and uncouples the receptor from GTP-binding proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **868**, 554-557.
- Maiese K., Swiriduk M. y Tenbroeke M. (1996). Cellular mechanisms of protection by metabotropic glutamate receptors during anoxia and nitric oxide toxicity. *J. Neurochem.* **66**, 2419-2428.
- Maitre, M. (1997). The gamma-hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications. *Progress in neurobiology* **51**, 337-361.
- Majerus W., Kisseleva M.V. and Norris F.A.. (1999). The role of phosphatases in inositol signaling reactions. *J. Biol. Chem.* **274** 10669-10672.
- Malcangio, M., and Bowery, N.G. (1993). Gamma-aminobutyric acidB, but not gamma-aminobutyric acidA receptor activation, inhibits electrically evoked substance P-like immunoreactivity release from the rat spinal cord in vitro. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **266**, 1490-1496.
- Malcangio, M., and Bowery, N.G. (1995). Possible therapeutic application of GABAB receptor agonists and antagonists. *Clinical neuropharmacology* **18**, 285-305.
- Malcangio, M., and Bowery, N.G. (1996). GABA and its receptors in the spinal cord. *Trends in pharmacological sciences* **17**, 457-462.
- Malenka, R.C., Madison, D.V., and Nicoll, R.A. (1986). Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature* **321**, 175-177.



- Malherbe P, Kratzeisen C, Lundstrom K, Richards JG, Faull RL, Mutel V (1999) Cloning and functional expression of alternative spliced variants of the human metabotropic glutamate receptor 8. *Brain Res Mol Brain Res* **67**:201-210
- Manahan-Vaughan D, Herrero I, Reymann KG and Sánchez-Prieto J. (1999). Presynaptic group 1 metabotropic glutamate receptors may contribute to the expression of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Neuroscience*. **94**(1):71-82
- Manita, S., Kawamura, Y., Sato, K., Inoue, M., Kudo, Y. and Miyakawa, H. (2004). Adenosine A1-receptor mediated tonic inhibition of glutamate release at rat hippocampal CA3-CA1 synapses is primarily due to inhibition of N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Eur. J. Pharmacol.* **499**, 265-274.
- Mannaioni G, Marino MJ, Valenti O, Traynelis SF, Conn PJ. 2001. Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function. *J. Neurosci.* **21**(16):5925-34
- Manning, J.P., Richards, D.A., and Bowery, N.G. (2003). Pharmacology of absence epilepsy. *Trends in pharmacological sciences* **24**, 542-549.
- Manzoni O.J., Finiels-Marlier F., Sassetti I., Bockaert J., Le Peuch C. y Sladeczek, F.A. (1990). The glutamate receptor of the Qp-type activates protein kinase C and is regulated by protein kinase C. *Neurosci. Lett.* **109**, 146-151
- Manzoni O., Prezeau L., Sladeczek F. y Bockaert J. (1992). Trans-ACPD inhibits cAMP formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *Eur. J. Pharmacol.* **225**, 357-358.
- Manzoni O. y Bockaert J. (1995). Metabotropic glutamate receptors inhibiting excitatory synapses in the CA1 area of rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **7**, 2518-2523.
- Marescaux, C., Vergnes, M., and Bernasconi, R. (1992). GABAB receptor antagonists: potential new anti-absence drugs. *Journal of neural transmission* **35**, 179-188
- Margeta-Mitrovic, M., Mitrovic, I., Riley, R.C., Jan, L.Y., and Basbaum, A.I. (1999). Immunohistochemical localization of GABA(B) receptors in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology* **405**, 299-321.
- Marks, G.A., Birabil, C.G., and Speciale, S.G. (2005). Adenosine A1 receptors mediate inhibition of cAMP formation in vitro in the pontine, REM sleep induction zone. *Brain research* **1061**, 124-127
- Martin LJ, Blackstone CD, Haganir RL, Price DL (1992) Cellular localization of a metabotropic glutamate receptor in rat brain. *Neuron* **9**:259-270
- Martinelli, G.P., Holstein, G.R., Pasik, P., and Cohen, B. (1992). Monoclonal antibodies for ultrastructural visualization of L-baclofen-sensitive GABAB receptor sites. *Neuroscience* **46**, 23-33.
- Mary S., Stephan D., Gomeza J., Bockaert J., Pruss R.M. y Pin J.P. (1997). The rat mGluR1d receptor splice variant shares functional properties with the other short isoforms of mGluR1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **335**, 65-72.
- Masu M., Tanabe Y., Tsuchida K., Shigemoto R. y Nakanishi S. (1991). Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* **349**, 760-765.
- Masu M., Iwakabe H., Tagawa Y., Miyoshi T., Yamashita M., Fukuda Y., Sasaki H., Hiroi K., Nakamura Y. y Shigemoto R. (1995). Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene. *Cell* **80**, 757-765.
- Mateos JM, Azkue J, Benitez R, Sarria R, Losada J, Conquet F, Ferraguti F, Kuhn R, Knopfel T, Grandes P (1998) Immunocytochemical localization of the mGluR1b metabotropic glutamate receptor in the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* **390**:225-233

- Mateos JM, Elezgarai I, Benitez R, Osorio A, Bilbao A, Azkue JJ, Kuhn R, Knopfel T, Grandes P (1999) Clustering of the group III metabotropic glutamate receptor 4a at parallel fiber synaptic terminals in the rat cerebellar molecular layer. *Neurosci Res* **35**:71-74
- Mateos JM, Benitez R, Elezgarai I, Azkue JJ, Lazaro E, Osorio A, Bilbao A, Donate F, Sarria R, Conquet F, Ferraguti F, Kuhn R, Knopfel T, Grandes P (2000) Immunolocalization of the mGluR1b splice variant of the metabotropic glutamate receptor 1 at parallel fiber-Purkinje cell synapses in the rat cerebellar cortex. *J Neurochem* **74**:1301-1309
- Mathiesen JM and Ramirez MT. (2006). The metabotropic glutamate receptor 4 is internalized and desensitized upon protein kinase C activation. *Br J Pharmacol*.**148**(3):279-90.
- Matsunami H. y Buck L.B. (1997). A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell* **90**, 775-784.
- McDonald, A.J., Mascagni, F., and Muller, J.F. (2004). Immunocytochemical localization of GABABR1 receptor subunits in the basolateral amygdala. *Brain research* **1018**, 147-158.
- McCool, B.A., Pin, J.P., Brust, P.F., Harpold, M.M., and Lovinger, D.M. (1996). Functional coupling of rat group II metabotropic glutamate receptors to an omega-conotoxin GVIA-sensitive calcium channel in human embryonic kidney 293 cells. *Molecular pharmacology* **50**, 912-922.
- McCool BA, Pin JP, Harpold MM, Brust PF, Stauderman KA and Lovinger DM. (1998). Rat group I metabotropic glutamate receptors inhibit neuronal Ca<sup>2+</sup> channels via multiple signal transduction pathways in HEK 293 cells. *J Neurophysiol*. **79**(1):379-91.
- McRory JE, Hamid J, Doering CJ, Garcia E, Parker R, Hamming K, Chen L, Hildebrand M, Beedle AM, Feldcamp L, et al. (2004) The *CACNA1F* gene encodes an L-type calcium channel with unique biophysical properties and tissue distribution. *J Neurosci* **24**:1707-1718.
- Meguro R, Ohishi H, Hoshino K, Hicks TP, Norita M (1999) Metabotropic glutamate receptor 2/3 immunoreactivity in the developing rat cerebellar cortex. *J Comp Neurol* **410**:243-255
- Melchiorri D., Bruno V., Besong G., Ngomba R. T., Cuomo L., De Blasi A., Copani A., Moschella C., Storto M., Nicoletti F., Lepperdinger G. and Passarelli F. (2001) The mammalian homologue of the novel peptide Bv8 is expressed in the central nervous system and supports neuronal survival by activating the MAP kinase/PI-3- kinase pathways. *Eur. J. Neurosci*. **13**, 1694-1702.
- de Mendonça A, Sebastião AM and Ribeiro JA. (2000). Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res Brain Res Rev*. **33**(2-3):258-74.
- Milani, D., Malgaroli, A., Guidolin, D., Fasolato, C., Skaper, S.D., Meldolesi, J., and Pozzan, T. (1990). Ca<sup>2+</sup> channels and intracellular Ca<sup>2+</sup> stores in neuronal and neuroendocrine cells. *Cell calcium* **11**, 191-199
- Millán, C., Luján, R., Shigemoto, R. and Sánchez-Prieto, J. (2002a). The inhibition of glutamate release by mGluR7 affects both [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and cAMP: evidence for a strong inhibition of Ca<sup>2+</sup> entry in single nerve terminals. *J. Biol. Chem.* **277**, 14092-14101.
- Millán, C., Luján, R., Shigemoto, R. and Sánchez-Prieto, J. (2002b). Subtypespecific expression of group III metabotropic glutamate receptors and Ca<sup>2+</sup> channels in single nerve terminals. *J. Biol. Chem.* **277**, 47796-47803.
- Millán, C. and Sánchez-Prieto, J. (2002c). Differential coupling of N and P/Q-type calcium channels to glutamate exocytosis in the rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* **330**, 29-32.
- Millán, C., Castro, E., Torres, M., Shigemoto, R., Sánchez-Prieto, J. (2003). Co-expression of metabotropic glutamate receptor 7 and N-type Ca<sup>2+</sup> channels in single cerebrocortical nerve terminals of adult rats. *J. Biol. Chem.* **278**, 23955-23962.

- Minakami R., Iida K., Hirakawa N y Sugiyama H. (1995). The expression of two splice variants of metabotropic glutamate receptor subtype 5 in the rat brain and neuronal cells during development. *J. Neurochem.* **65**, 1536-1542.
- Minakami R., Jinnai N. y Sugiyama H. (1997). Phosphorylation and calmodulin binding of the metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGluR5) are antagonistic in vitro. *J. Biol. Chem.* **272**, 20291-20298.
- Mineff E. y Valtschanoff J. (1999). Metabotropic glutamate receptors 2 and 3 expressed by astrocytes in rat ventrobasal thalamus. *Neurosci. Lett.* **270**, 95-98
- Misura, K.M., Scheller, R.H., and Weis, W.I. (2000). Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature* **404**, 355-362.
- Mintz, I.M., Sabatini, B.L. and Regher, W.G. (1995). Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron* **15**, 675-688.
- Mitchell, S.J., and Silver, R.A. (2000). Glutamate spillover suppresses inhibition by activating presynaptic mGluRs. *Nature* **404**, 498-502
- Mitsukawa, K., Yamamoto, R., Ofner, S., Nozulak, J., Pescott, O., Lukic, S., Stoehr, N., Mombereau, C., Kuhn, R., McAllister, K.H., van der Putten, H., Cryan, J.F. and Flor, P.J. (2005). A selective metabotropic glutamate receptor 7 agonist: activation of receptor signaling via an allosteric site modulates stress parameters in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 18712-18717.
- Miura M, Watanabe M, Offermanns S, Simon MI, Kano M (2002) Group I metabotropic glutamate receptor signaling via  $\text{G}\alpha_q/\text{G}\alpha_{11}$  secures the induction of long-term potentiation in the hippocampal area CA1. *J Neurosci* **22**:8379-8390
- Mizuguchi M, Yamada M, Kim SU, and Rhee SG. (1991). Phospholipase C isozymes in neurons and glial cells in culture: an immunocytochemical and immunochemical study. *Brain Res* **548**: 35-40.
- Mochida, S., Sheng, Z.H., Baker, C., Kobayashi, H., and Catterall, W.A. (1996). Inhibition of neurotransmission by peptides containing the synaptic protein interaction site of N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Neuron* **17**, 781-788.
- Mochida, S., Westenbroek, R.E., Yokoyama, C.T., Zhong, H., Myers, S.J., Scheuer, T., Itoh, K., and Catterall, W.A. (2003). Requirement for the synaptic protein interaction site for reconstitution of synaptic transmission by P/Q-type calcium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 2819-2824.
- Moldavan, M.G., Irwin, R.P., and Allen, C.N. (2006). Presynaptic GABA(B) receptors regulate retinohypothalamic tract synaptic transmission by inhibiting voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Journal of neurophysiology* **95**, 3727-3741.
- Moldrich, R.X., Chapman, A.G., De Sarro, G., and Meldrum, B.S. (2003). Glutamate metabotropic receptors as targets for drug therapy in epilepsy. *European journal of pharmacology* **476**, 3-16
- Molineux ML, McRory JE, McKay BE, Hamid J, Mehaffey WH, Rehak R, Snutch TP, Zamponi GW, and Turner RW (2006) Specific T-type calcium channel isoforms are associated with distinct burst phenotypes in deep cerebellar nuclear neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:5555-5560.
- Morishita, W., and Sastry, B.R. (1994). Presynaptic actions of GABA and baclofen in CA1 region of the guinea-pig hippocampus in vitro. *Neuroscience* **61**, 447-455.
- Moritz A, Scheschonka A, Beckhaus T, Karas M and Betz H. (2009) Metabotropic glutamate receptor 4 interacts with microtubule-associated protein 1B. *Biochem Biophys Res Commun.* **390**(1):82-6.
- Moss FJ, Viard P, Davies A, Bertaso F, Page KM, Graham A, Canti C, Plumpton M, Plumpton C, Clare JJ, et al. (2002) The novel product of a five-exon stargazin-related gene abolishes  $\text{CaV}2.2$  calcium channel expression. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* **21**:1514-1523.

- Muller, C.E. (2001). A1 adenosine receptors and their ligands: overview and recent developments. *Farmaco* **56**, 77-80
- Mundell SJ, Matharu AL, Pula G, Roberts PJ and Kelly E. (2001). Agonist-induced internalization of the metabotropic glutamate receptor 1a is arrestin- and dynamin-dependent. *J Neurochem* **78**:546-551
- Mundell SJ, Matharu AL, Pula G, Holman D, Roberts PJ and Kelly E. (2002). Metabotropic glutamate receptor 1 internalization induced by muscarinic acetylcholine receptor activation: differential dependency of internalization of splice variants on nonvisual arrestins. *Mol Pharmacol.* **61**(5):1114-23.
- Mundell SJ, Pula G, Carswell K, Roberts PJ and Kelly E. (2003). Agonist-induced internalization of metabotropic glutamate receptor 1A: structural determinants for protein kinase C- and G protein-coupled receptor kinase-mediated internalization. *J Neurochem.* **84**(2):294-304
- Murakami, N., Ishibashi, H., Katsurabayashi, S., and Akaike, N. (2002). Calcium channel subtypes on single GABAergic presynaptic terminal projecting to rat hippocampal neurons. *Brain research* **951**, 121-129.
- Muto T, Tsuchiya D, Morikawa A, Jingami H. (2007). Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**(10):3759-64
- Nagy, G., Matti, U., Nehring, R.B., Binz, T., Rettig, J., Neher, E., and Sorensen, J.B. (2002). Protein kinase C-dependent phosphorylation of synaptosome-associated protein of 25 kDa at Ser187 potentiates vesicle recruitment. *The Journal of Neuroscience* **22**, 9278-9286
- Nakagawasai O, Onogi H, Mitazaki S, Sato A, Watanabe K, Saito H, Murai S, Nakaya K, Murakami M, Takahashi E, Tan-No K and Tadano T. (2010). Behavioral and neurochemical characterization of mice deficient in the N-type Ca<sup>2+</sup> channel alpha1B subunit. *Behav Brain Res.* **208**(1):224-30.
- Nakajima Y., Iwakabe H., Akazawa C., Nawa H., Shigemoto R., Mizuno N. y Nakanishi S. (1993). Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J. Biol. Chem.* **268**, 11868-11873.
- Nakajima, Y., Yamamoto, T., Nakayama, T. & Nakanishi, S. (1999). A relationship between protein kinase C phosphorylation and calmodulin binding to the metabotropic glutamate. *J. Biol. Chem.*, **27**, 27573-27577.
- Nakanishi S. (1994). Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron.* **13**(5):1031-7
- Neki A, Ohishi H, Kaneko T, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N (1996) Pre- and postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the rat brain: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody. *Neurosci Lett* **202**:197-200
- Newberry, N.R., and Nicoll, R.A. (1984). Direct hyperpolarizing action of baclofen on hippocampal pyramidal cells. *Nature* **308**, 450-452
- Newcomb R, Szoke B, Palma A, Wang G, Chen X, Hopkins W, Cong R, Miller J, Urge L, Tarczy-Hornoch K, et al. (1998) Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* **37**:15353-15362.
- Newton, A.C. (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chemical reviews* **101**, 2353-2364
- Ng, G.Y., Bertrand, S., Sullivan, R., Ethier, N., Wang, J., Yergey, J., Belley, M., Trimble, L., Bateman, K., Alder, L., et al. (2001). Gamma-aminobutyric acid type B receptors with specific heterodimer composition and postsynaptic actions in hippocampal neurons are targets of anticonvulsant gabapentin action. *Molecular pharmacology* **59**, 144-152.

- Nicholls, D.G., Sihra, T.S. and Sánchez-Prieto, J. (1987). Calcium-dependent and- independent release of glutamate from synaptosomes monitor by continuous fluorimetry. *J. Neurochem.* **49**, 50-57.
- Nicholls D.G. (1989). Release of glutamate, aspartate, and gamma-aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* **52**, 331-341.
- Nicoletti F., Meek J.L., Iadarola M.J., Chuang D.M., Roth D.L. y Costa E. (1986a). Coupling of inositol phospholipid metabolism with excitatory aminoacid recognition sites in rat hippocampus. *J. Neurochem.* **46**, 40-46.
- Nicoletti F., Wroblewski J.T., Iadarola M.J. y Costa E. (1986b). Serine-O-phosphate, an endogenous metabolite, inhibits the stimulation of inositol phospholipid hydrolysis elicited by ibotenic acid in rat hippocampal slices. *Neuropharmacology* **25**, 335-338.
- Nicoletti F., Wroblewski J.T., Novelli A., Alho H., Guidotti A. y Costa E. (1986c). The activation of inositol phospholipid metabolism as a signal-transducing system for excitatory aminoacids in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* **6**, 1905-1911.
- Nili, U., de Wit, H., Gulyas-Kovacs, A., Toonen, R.F., Sorensen, J.B., Verhage, M., and Ashery, U. (2006). Munc18-1 phosphorylation by protein kinase C potentiates vesicle pool replenishment in bovine chromaffin cells. *Neuroscience* **143**, 487-500.
- Niswender CM, Johnson KA, Luo Q, Ayala JE, Kim C, et al. 2008. A novel assay of Gi/o-linked G protein-coupled receptor coupling to potassium channels provides new insights into the pharmacology of the group III metabotropic glutamate receptors. *Mol. Pharmacol.* **73**(4):1213-24
- Niswender CM and Conn PJ. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **50**, 295-322.
- Noguchi, J., and Yamashita, H. (2000). Adenosine inhibits voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> currents in rat dissociated supraoptic neurones via A1 receptors. *The Journal of physiology* **526**, 313-326.
- Nowycky M.C., Fox A.P. and Tsien R.W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* **316**, 440-443.
- Nusser Z, Mulvihill E, Streit P, Somogyi P (1994) Subsynaptic segregation of metabotropic and ionotropic glutamate receptors as revealed by immunogold localization. *Neuroscience* **61**:421-427
- Ochiishi, T., Chen, L., Yukawa, A., Saitoh, Y., Sekino, Y., Arai, T., Nakata, H., and Miyamoto, H. (1999). Cellular localization of adenosine A1 receptors in rat forebrain: immunohistochemical analysis using adenosine A1 receptor-specific monoclonal antibody. *The Journal of comparative neurology* **411**, 301-316
- O'Connor JJ, Rowan MJ and Anwyl R. (1995). Tetanically induced LTP involves a similar increase in the AMPA and NMDA receptor components of the excitatory postsynaptic current: investigations of the involvement of mGlu receptors. *J Neurosci.* **15**(3 Pt 1):2013-20.
- O'Connor, V., El Far, O., Bodill-Cardona, E., Nanoff, C., Freissmuth, M., Karschin, M., Airas, J., Betz, H. and Boehm, S. (1999). Calmodulin dependence of presynaptic metabotropic glutamate receptor signaling. *Science* **286**, 1180-1184.
- O'Connor RM, Finger BC, Flor PJ and Cryan JF. (2010). Metabotropic glutamate receptor 7: at the interface of cognition and emotion. *Eur J Pharmacol.* **639**(1-3):123-31.
- Odagaki Y and Fuxe K. (1995). 5-HT<sub>1A</sub>, GABAB, and pirenzepine-insensitive muscarinic receptors are functionally coupled to distinct pools of the same kind of G proteins in rat hippocampus. *Brain Res.* **689**(1):129-35.



- O'Hara P.J., Sheppard P.O., Thøgersen H., Venezia D., Haldeman B.A., McGrane V., Houamed K.M., Thomsen C., Gilbert T.L. y Mulvihill E.R. (1993). The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* **11**, 41-52.
- Ohishi, H., Akazawa, C., Shigemoto, R., Nakanishi, S. and Mizuno, N. (1995). Distribution of the mRNAs for L-2-amino-4-phosphonobutyrate-sensitive metabotropic glutamate receptors, mGluR4 and mGluR7, in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **360**, 555-570.
- Ohishi H, Neki A, Mizuno N (1998) Distribution of a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat and mouse: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody. *Neurosci Res* **30**:65-82
- Ong, J., Bexis, S., Marino, V., Parker, D.A., Kerr, D.I., and Froestl, W. (2001). Comparative activities of the enantiomeric GABA(B) receptor agonists CGP 44532 and 44533 in central and peripheral tissues. *European journal of pharmacology* **412**, 27-37
- Ongini E., Schubert.P. (1998). Neuroprotection induced by stimulating A1 or blocking A2A adenosine receptors: an apparent paradox. *Drug development research* **45**, 387-393
- Otmakhova, N.A., and Lisman, J.E. (2004). Contribution of Ih and GABAB to synaptically induced afterhyperpolarizations in CA1: a brake on the NMDA response. *Journal of neurophysiology* **92**, 2027-2039.
- Ohtsuka T, Takao-Rikitsu E, Inoue E, Inoue M, Takeuchi M, Matsubara K, Deguchi-Tawarada M, Satoh K, Morimoto K, Nakanishi H and Takai Y. (2002). Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc13-1. *J Cell Biol.* **158**(3):577-90.
- Ohtsuki T, Koga M, Ishiguro H, Horiuchi Y, Arai M, Niizato K, Itokawa M, Inada T, Iwata N, Iritani S, Ozaki N, Kunugi H, Ujike H, Watanabe Y, Someya T, and Arinami T. (2008). A polymorphism of the metabotropic glutamate receptor mGluR7 (GRM7) gene is associated with schizophrenia. *Schizophr Res.* **101**(1-3):9-16.
- Okamoto, N., Hori, S., Akazawa, C., Hayashi, Y., Shigemoto, R., Mizuno, N. and Nakanishi, S. (1994). Molecular characterization of a new metabotropic glutamate receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP signal transduction. *J. Biol. Chem.* **269**, 1231-1236.
- Olivera, B.M., Gray, W.R., Zeikus, R., McIntosh, J.M., River, J., Santos, V. and Cruz, L.L. (1985). Peptides neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science* **230**, 1338-1343.
- Olpe, H.R., Karlsson, G., Pozza, M.F., Brugger, F., Steinmann, M., Van Riezen, H., Fagg, G., Hall, R.G., Froestl, W., and Bittiger, H. (1990). CGP 35348: a centrally active blocker of GABAB receptors. *European journal of pharmacology* **187**, 27-38
- Ong, J., Bexis, S., Marino, V., Parker, D.A., Kerr, D.I., and Froestl, W. (2001). Comparative activities of the enantiomeric GABA(B) receptor agonists CGP 44532 and 44533 in central and peripheral tissues. *European journal of pharmacology* **412**, 27-37.
- Opatowsky Y, Chen CC, Campbell KP, and Hirsch JA (2004) Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel  $\alpha_1$  subunit functional core and its complex with the  $\alpha_2\delta_1$  interaction domain. *Neuron* **42**:387-399.
- Page KM, Stephens GJ, Berrow NS, and Dolphin AC (1997) The intracellular loop between domains I and II of the B-type calcium channel confers aspects of Gprotein sensitivity to the E-type calcium channel. *J Neurosci* **17**:1330-1338.
- Page KM, Canti C, Stephens GJ, Berrow NS, and Dolphin AC (1998) Identification of the amino terminus of neuronal  $\text{Ca}_v2.1$  channel  $\alpha_1$  subunits  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1E}$  as an essential determinant of G-protein modulation. *J Neurosci* **18**:4815-4824.

- Pan BX, Dong Y, Ito W, Yanagawa Y, Shigemoto R and Morozov A. (2009). Selective gating of glutamatergic inputs to excitatory neurons of amygdala by presynaptic GABA<sub>B</sub> receptor. *Neuron*. **61**(6):917-29.
- Paquet M, Smith Y (2003) Group I metabotropic glutamate receptors in the monkey striatum: subsynaptic association with glutamatergic and dopaminergic afferents. *J Neurosci* **23**:7659–7669
- Parfitt, K.D. and Madison, D.V. (1993). Phorbol esters enhance synaptic transmission by a presynaptic, calcium-dependent mechanism in rat hippocampus. *J. Physiol.* **526**, 349-357.
- Park D, Jhon DY, Lee CW, Lee KH, and Rhee SG. Activation of phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits. *J Biol Chem* **268**: 4573–4576, 1993.
- Parker, D.A., Ong, J., Marino, V., and Kerr, D.I. (2004). Gabapentin activates presynaptic GABA<sub>B</sub> heteroreceptors in rat cortical slices. *European journal of pharmacology* **495**, 137-143.
- L. Parthasarathy, R.E. Vadnal, R. Parthasarathy and C.S. Devi (1994) Biochemical and molecular properties of lithium-sensitive myoinositol monophosphatase. *Life Sci.* **54** 1127–1142.
- Partovi, D. and Frerking, M. (2006). Presynaptic inhibition by kainate receptors converges mechanistically with presynaptic inhibition by adenosine and GABA<sub>B</sub> receptors. *Neuropharmacology* **51**, 1030–1037.
- Patel, M.K., Pinnock, R.D., and Lee, K. (2001). Adenosine exerts multiple effects in dorsal horn neurones of the adult rat spinal cord. *Brain research* **920**, 19-26
- Pattni K and Banting G. (2004). Ins (1,4,5) P<sub>3</sub> metabolism and the family of IP<sub>3</sub>–3Kinases. *Cell Signal.* **16** 643–654.
- Pearce B., Albrecht J., Morrow C. y Murphy S. (1986). Astrocyte glutamate receptor activation promotes inositol phospholipid turnover and calcium influx. *Neurosci. Lett.* **72**, 335-340.
- Pelkey, K., Lavezzar, G., Racca, C., Roche, K.W. and McBain, C.J. (2005). mGluR7 is a metaplastic switch controlling bi-directional plasticity of feedforward inhibition. *Neuron* **46**, 89–102.
- Pelkey, K., Topolnik, L., Lacaille, J.-C. and C.McBain, J. (2006). Compartmentalized Ca<sup>2+</sup> channel regulation at divergent mossy fiber release sites underlies target cell-dependent plasticity. *Neuron* **52**, 497–510.
- Pelkey, K.A., Yuan, X., Lavezzari, G., Roche, K.W. and McBain, C.J. (2007). mGluR7 undergoes rapid internalization in response to activation by the allosteric agonist AMN082. *Neuropharmacology* **52**, 108-117.
- Pelkey, K.A., Topolnik, L., Yuan, X-Q., Lacaille, J-C. and McBain, C.J. (2008). State-dependent cAMP sensitivity of presynaptic function underlies metaplasticity in a hippocampal feedforward inhibitory circuit. *Neuron* **60**, 980-987.
- Perez-Garci, E., Gassmann, M., Bettler, B., and Larkum, M.E. (2006). The GABA<sub>B</sub>1b isoform mediates long-lasting inhibition of dendritic Ca<sup>2+</sup> spikes in layer 5 somatosensory pyramidal neurons. *Neuron* **50**, 603-616.
- Perkinton, M.S., and Sihra, T.S. (1998). Presynaptic GABA(B) receptor modulation of glutamate exocytosis from rat cerebrocortical nerve terminals: receptor decoupling by protein kinase C. *Journal of neurochemistry* **70**, 1513-1522
- Perroy, J., Prezeau, L., De Waard, M., Shigemoto, R., Bockaert, J. and Fagni, L. (2000). Selective blockade of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels by the metabotropic glutamate receptor type 7 involves a phospholipase C pathway in neurons. *J. Neurosci.* **20**, 7896–7904.

- Perroy, J., El Far, O., Bertaso, F., Pin, J.P., Betz, H., Bockaert, J. & Fagni, L. (2002). PICK1 is required for the control synaptic transmission by the metabotropic glutamate receptor 7. *EMBO J.*, **21**, 2990–2999.
- Petralia RS, Wang YX, Niedzielski AS, Wenthold RJ (1996) The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience* **71**:949–976
- Phillips T., Makoff A., Murrison E., Mimmack M., Waldvogel H., Faull R., Rees S. y Emson P. (1998). Immunohistochemical localisation of mGluR7 protein in the rodent and human cerebellar cortex using subtype specific antibodies. *Mol. Brain Res.* **57**, 132–141.
- Piccinin S, Cinque C, Calò L, Molinaro G, Battaglia G, Maggi L, Nicoletti F, Melchiorri D, Eusebi F, Massey PV and Bashir ZI. (2010). Interaction between Ephrins and mGlu5 metabotropic glutamate receptors in the induction of long-term synaptic depression in the hippocampus. *J Neurosci.* **30**(8):2835–43.
- Pickering DS, Thomsen C, Suzdak PD, Fletcher EJ, Robitaille R, Salter MW, MacDonald JF, Huang XP and Hampson DR. (1993). A comparison of two alternatively spliced forms of a metabotropic glutamate receptor coupled to phosphoinositide turnover. *J Neurochem.* **61**(1):85–92
- Piedras-Renteria, E.S., Pyle, J.L., Diehn, M., Glickfeld, L.L., Harata, N.C., Cao, Y., Kavalali, E.T., Brown, P.O., and Tsien, R.W. (2004). Presynaptic homeostasis at CNS nerve terminals compensates for lack of a key Ca<sup>2+</sup> entry pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 3609–3614.
- Pin J.P., Waeber C., Prezeau L., Bockaert J. y Heinemann S.F. (1992). Alternative splicing generates metabotropic glutamate receptors inducing different patterns of calcium release in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10331–10335.
- Pin J.P., Joly C., Heinemann S.F. y Bockaert J. (1994). Domains involved in the specificity of G protein activation in phospholipase C coupled metabotropic glutamate receptor. *EMBO J.* **13**, 342–348.
- Pin, J-P. and Duvoisin, R. (1995). The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology*, **34**, 1–26.
- Pisani A, Gubellini P, Bonsi P, Conquet F, Picconi B, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P (2001) Metabotropic glutamate receptor 5 mediates the potentiation of N-methyl-D-aspartate responses in medium spiny striatal neurons. *Neuroscience* **106**:579–587
- Pizzi M., Benarese M., Boroni F., Goffi F., Valerio A. y Spano P.F. (2000). Neuroprotection by metabotropic glutamate receptor agonists on kainate-induced degeneration of motor neurons in spinal cord slices from adult rat. *Neuropharmacol.* **39**, 903–910.
- Ponce, A., Bueno, E., Kentros, C., Vega-Saenz de Miera, E., Chow, A., Hillman, D., Chen, S., Zhu, L., Wu, M.B., Wu, X., *et al.* (1996). G-protein-gated inward rectifier K<sup>+</sup> channel proteins (GIRK1) are present in the soma and dendrites as well as in nerve terminals of specific neurons in the brain. *The Journal of Neuroscience* **16**, 1990–2001
- Poncer, J.C., McKinney, R.A., Gahwiler, B.H., and Thompson, S.M. (2000). Differential control of GABA release at synapses from distinct interneurons in rat hippocampus. *The Journal of physiology* **528 Pt 1**, 123–130.
- Potier, B., and Dutar, P. (1993). Presynaptic inhibitory effect of baclofen on hippocampal inhibitory synaptic transmission involves a pertussis toxin-sensitive G-protein. *European journal of pharmacology* **231**, 427–433
- Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, and Campbell KP (1994) Calcium channel  $\alpha_1$ -subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the  $\alpha_1$ -subunit. *Nature (Lond)* **368**:67–70.



- Prézeau L., Manzoni O., Homburger V., Sladeczek F., Curry K. y Bockaert J. (1992). Characterization of a metabotropic glutamate receptor: direct negative coupling to adenylyl cyclase and involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 8040-8044.
- Prézeau L., Carrette J., Hulpap B., Curry K., Pin J.P. y Bockaert J. (1994). Pharmacological characterization of metabotropic glutamate receptors in several types of brain cells in primary cultures. *Mol. Pharmacol.* **45**, 570-577
- Price GW, Wilkin GP, Turnbull MJ and Bowery NG. (1984). Are baclofen-sensitive GABAB receptors present on primary afferent terminals of the spinal cord? *Nature*. **307(5946)**:71-4
- Qian, J. and Saggau, P. (1997). Presynaptic inhibition of synaptic transmission in the rat hippocampus by activation of muscarinic receptors: involvement of presynaptic calcium influx. *Br. J. Pharmacol.* **122**, 511-519.
- Qian, J., and Saggau, P. (1999). Modulation of transmitter release by action potential duration at the hippocampal CA3-CA1 synapse. *Journal of neurophysiology* **81**, 288-298.
- Qian, J. and Noebels, J.L. (2001). Presynaptic Ca<sup>2+</sup> influx at a mouse central synapse with Ca<sup>2+</sup> channels subunit modulation. *J. Neurosci.* **21**, 3721-3728..
- Qin N, Platano D, Olcese R, Stefani E, and Birnbaumer L (1997) Direct interaction of G<sub>β</sub> with a C-terminal G<sub>β</sub>-binding domain of the Ca<sub>v</sub>2<sub>1</sub> channel <sub>1</sub> subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:8866-8871.
- Qin N, Platano D, Olcese R, Costantin JL, Stefani E, and Birnbaumer L (1998) Unique regulatory properties of the type 2a Ca<sub>v</sub>2<sub>1</sub> channel <sub>1</sub> subunit caused by palmitoylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:4690-4695.
- Rahman, S., and Neuman, R.S. (1996). Characterization of metabotropic glutamate receptor-mediated facilitation of N-methyl-D-aspartate depolarization of neocortical neurones. *British journal of pharmacology* **117**, 675-683
- Randall, A., and Tsien, R.W. (1995). Pharmacological dissection of multiple types of Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat cerebellar granule neurons. *The Journal of Neuroscience* **15**, 2995-3012.
- Rebecchi, M.J. and Pentylä, S.N. (2000). Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Rev.* **80**, 1291-1335.
- Reid, C., Bekkers, J.M. and Clements, J.C. (2003). Presynaptic Ca<sup>2+</sup> channel: a functional patchwork. *Trends Neurosci.* **26**, 683-687.
- Reuter, H. (1983). Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature* **301**, 569-574.
- Reuter, H. (1995). Measurements of exocytosis from single presynaptic nerve terminals reveal heterogeneous inhibition by Ca<sup>(2+)</sup>-channel blockers. *Neuron* **14**, 773-779.
- Rhee SG (1991). Inositol phospholipids-specific phospholipase C: interaction of the gamma 1 isoform with tyrosine kinase. *Trends Biochem Sci* **16**: 297-301.
- Rhee, S-G. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 281-312.
- Rhee, J-S., Betz, A., Pyott, S., Reim, K., Varoqueaux, F., Augustin, I., Hesse, D., Südhof, T.C., Takahashi, M., Rosenmund, C. and Brose, N. (2002). Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs. *Cell* **108**, 121-133.

- Richards MW, Butcher AJ, and Dolphin AC (2004) Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> channel  $\alpha$ -subunits: structural insights AID our understanding. *Trends Pharmacol Sci* **25**:626–632.
- Richmond JE, Weimer RM and Jorgensen EM.(2001). An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming. *Nature*. **412(6844)**:338–41
- Riedel, G., Platt, B., and Micheau, J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural brain research* **140**, 1–47.
- Rodrigues S.M., Bauer E.P., Farb C.R., Schafe G.E. y LeDoux J.E. (2002). The group I metabotropic glutamate receptor mGluR5 is required for fear memory formation and long-term potentiation in the lateral amygdala. *J. Neurosci.* **22**, 5219–5229.
- Rodríguez-Castañeda F, Maestre-Martínez M, Coudeville N, Dimova K, Junge H, Lipstein N, Lee D, Becker S, Brose N, Jahn O, Carlomagno T and Griesinger C. (2010). Modular architecture of Munc13/calmodulin complexes: dual regulation by Ca<sup>2+</sup> and possible function in short-term synaptic plasticity. *EMBO J.* **29(3)**:680–91.
- Rodríguez-Moreno, A., Sistiaga, A., Lerma, J. and Sánchez-Prieto, J. (1998). Switch from facilitation to inhibition of excitatory synaptic transmission by the desensitisation of group I mGluRs in the rat hippocampus. *Neuron* **21**, 1477–1486.
- Rondard P, et al. 2006. Coupling of agonist binding to effector domain activation in metabotropic glutamate-like receptors. *J. Biol. Chem.* **281(34)**:24653–61
- Ross CA, Maccumber MW, Glatt CE, and Snyder SH (1989) Brain phospholipase C isozymes: differential mRNA localizations by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2923–2927, 1989.
- Rosemond, E., Wang, M., Yao, Y., Storzjohann, L., Stormann, T., Johnson, E.C., and Hampson, D.R. (2004). Molecular basis for the differential agonist affinities of group III metabotropic glutamate receptors. *Molecular pharmacology* **66**, 834–842
- Rosenbrock H, Kramer G, Hobson S, Koros E, Grundl M, Grauert M, Reymann KG and Schröder UH. (2010). Functional interaction of metabotropic glutamate receptor 5 and NMDA-receptor by a metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulator. *Eur J Pharmacol.* **639(1-3)**:40–6.
- Rosenmund, C., Sigler, A., Augustin, I., Reim, K., Brose, N. and Rhee, J-S. (2002). Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms. *Neuron* **33**, 411–421.
- Rosenmund, C., Rettig, J. and Brose, N. (2003). Molecular mechanisms of active zone function. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**, 509–519.
- Rousset M, Cens T, Restituito S, Barrere C, Black JL 3rd, McEnery MW, and Charnet P (2001) Functional roles of  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  and  $\alpha_4$ , three new Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> channel subunits, in P/Q-type Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol (Lond)* **532 (Pt 3)**:583–593.
- Roustan P, Abitbol M, Menini C, Ribeau deau F, Gerard M, Vekemans M, Mallet J, and Dufier JL.(1995). The rat phospholipase C beta 4 gene is expressed at high abundance in cerebellar Purkinje cells. *Neuroreport* **6**: 1837–1841.
- Rubio I., Torres M., Miras-Portugal M.T. y Sanchez-Prieto J. (1991). Ca<sup>2+</sup>-independent release of glutamate during in vitro anoxia in isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* **57**, 1159–1164.
- Rudolphi, K.A., Schubert, P., Parkinson, F.E., and Fredholm, B.B. (1992). Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia. *Trends in pharmacological sciences* **13**, 439–445.
- Ruth, P., Rohrkasten, A., Biel, M., Bosse, E., Regulla, S., Meyer, H.E., Flockerzi, V., and Hofmann, F. (1989). Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science (New York), N.Y* **245**, 1115–1118

- Sabatini, B.L., and Regehr, W.G. (1997). Control of neurotransmitter release by presynaptic waveform at the granule cell to Purkinje cell synapse. *The Journal of Neuroscience* **17**, 3425-3435
- Saegusa H, Matsuda Y and Tanabe T. (2002). Effects of ablation of N- and R-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels on pain transmission. *Neurosci Res.* **43**(1):1-7
- Sahara Y. y Westbrook G.L. (1993). Modulation of calcium currents by a metabotropic glutamate receptor involves fast and slow kinetic components in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **13**, 3041-3050
- Sakaba, T., and Neher, E. (2003). Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA(B) receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature* **424**, 775-778
- Sallese, M., Salvatore, L., D'Urbano, E., Sala, G., Storto, M., Launey, T., Nicoletti, F., Knopfel, T. and De Blasi, A., (2000). The G-protein-coupled receptor kinase GRK4 mediates homologous desensitization of metabotropic glutamate receptor 1. *Faseb J.* **14**, 2569-2580.
- San Gabriel A, Uneyama H, Yoshie S, Torii K. (2005). Cloning and characterization of a novel mGluR1 variant from vallate papillae that functions as a receptor for L-glutamate stimuli. *Chem. Senses.* **30**(Suppl1):i25-26
- San Gabriel A, Maekawa T, Uneyama H, Torii K. (2009). Metabotropic glutamate receptor type 1 in taste tissue. *Am. J. Clin. Nutr.* **90**:743S-46S
- Sansig, G., Bushell, T.J., Clarke, V.R.J., Rozov, A., Burnashev, N., Portet, C., Gasparini, F., Schmottz, M., Klebs, K., Shigemoto, R., Flor, P.J., Kuhn, R., Knoepfel, T., Schroeder, M., Hampson, D.R., Collet, V.J., Zhang, C., Duvoisin, R.M., Collingridge, G.L. and Van der Putten, H. et al., (2001). Increased seizure susceptibility in mice lacking metabotropic glutamate receptor 7. *J. Neurosci.* **21**, 8734-8745.
- Sankaran B, Osterhout J, Wu D, AND Smrcka AV. Identification of a structural element in phospholipase C beta2 that interacts with G protein betagamma subunits. *J Biol Chem* **273**: 7148-7154, 1998.
- Saransaari, P., and Oja, S.S. (2005). Characteristics of GABA release in mouse brain stem slices under normal and ischemic conditions. *Neurochemical research* **30**, 1549-1556
- Sartorius LJ, Nagappan G, Lipska BK, Lu B, Sei Y, et al. 2006. Alternative splicing of human metabotropic glutamate receptor 3. *J. Neurochem.* **96**(4):1139-48
- Saugstad, J.A., Kinzie, J.M., Mulvihill, E.R., Segerson, T.P. and Westbrook. G.L. (1994). Cloning and expression of a new member of the L-2-amino-4- phosphonobutyric acid-sensitive class of metabotropic glutamate receptors. *Mol. Pharmacol.* **45**, 367-372.
- Saugstad J.A., Kinzie J.M., Shimonara M.M., Segerson T.P. y Westbrook G.L. (1997). Cloning and expression of a rat metabotropic glutamate receptor 8 reveals distinct pharmacological profile. *Mol. Pharmacol.* **51**, 119-125.
- Saugstad JA, Yang S, Pohl J, Hall RA and Conn PJ. (2002). Interaction between metabotropic glutamate receptor 7 and alpha tubulin. *J Neurochem.* **80**(6):980-8
- Saunders, C.M. et al. (2002) PLCz: a sperm-specific trigger of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in eggs and embryo development. *Development* **129**, 3533-3544
- Scanziani, M., Capogna, M., Gähwiler, B.H., and Thompson, S.M. (1992). Presynaptic inhibition of miniature excitatory synaptic currents by baclofen and adenosine in the hippocampus. *Neuron* **9**, 919-927.
- Scanziani, M., Gähwiler, B.H. and Thompson, S.M. (1993). Presynaptic inhibition of excitatory synaptic transmission mediated by  $\beta$ -adrenergic receptors in area CA3 of the rat hippocampus in vitro. *J. Neurosci.* **13**, 5393-5401.

- Scanziani M., Salin P.A., Vogt K.E., Malenka R.C. y Nicoll R.A. (1997). Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors. *Nature* **385**, 630-634.
- Scanziani, M., Gahwiler, B. and Chazpak, S. (1998). Target cell-specific modulation of transmitter release at terminals from a single axon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 12004-12009.
- Schaffhauser H., Cartmell J., Jakob-Rotne R. y Mutel V. (1997). Pharmacological characterization of metabotropic glutamate receptors linked to the inhibition of adenylate cyclase activity in rat striatal slices. *Neuropharmacol.* **36**, 933-940.
- Schmalzing G. (1985). Mechanism of depolarization of rat cortical synaptosomes at submicromolar external  $\text{Ca}^{2+}$  activity. *Biochem. J.* **225**, 671-680.
- Schneggenburger, R. and Neher, E. (2005). Presynaptic calcium and control of vesicular fusion. *Curr. Opin. Neurobiol.* **15**, 266-274.
- Scheyer, R.D. (1998). Involvement of glutamate in human epileptic activities. *Progress in brain research* **116**, 359-369.
- Schoepp D.D., Bockaert J. y Sladeczek F. (1990). Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory aminoacid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 508-515.
- Schoepp D.D. y Johnson B.G. (1993). Pharmacology of metabotropic glutamate receptor inhibition of cyclic AMP formation in the adult rat hippocampus. *Neurochem. Int.* **22**, 277-283.
- Schoepp D.D., Jane D.E. y Monn J.A. (1999). Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacol.* **38**, 1431-1476.
- Scholz, K.P., and Miller, R.J. (1991). Analysis of adenosine actions on  $\text{Ca}^{2+}$  currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal pyramidal neurones. *The Journal of physiology* **435**, 373-393.
- Scholtz, K.P. and Miller, J.R. (1995). Developmental changes in presynaptic calcium channels coupled to glutamate release in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **15**, 4612-4617.
- Scholtz, K.P. and Miller, J.R. (1996). Presynaptic inhibition at excitatory hippocampal synapses: Development and role of presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J. Neurophysiol.* **76**, 39-46.
- Schulz HL, Stohr H and Weber BH (2002) Characterization of three novel isoforms of the metabotropic glutamate receptor 7 (GRM7). *Neurosci Lett* **326**:37-40
- Schwartz N.E. y Alford S. (2000). Physiological activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors increases intracellular calcium and glutamate release. *J. Neurophysiol.* **84**, 415-427.
- Scott I.D. and Nicholls D.G. (1980). Energy transduction in intact synaptosomes. Influence of plasma-membrane depolarization on the respiration and membrane potential of internal mitochondria determined in situ. *Biochem. J.* **186**, 21-33.
- Selley, D.E., Cassidy, M.P., Martin, B.R., and Sim-Selley, L.J. (2004). Long-term administration of Delta9-tetrahydrocannabinol desensitizes CB1-, adenosine A1-, and GABAB-mediated inhibition of adenylyl cyclase in mouse cerebellum. *Molecular pharmacology* **66**, 1275-1284.
- Semyanov A. y Kullmann D.M. (2000). Modulation of GABAergic signaling among interneurons by metabotropic glutamate receptors. *Neuron* **25**, 663-672.
- Servitja J.M., Masgrau R., Sarri E. y Picatoste F. (1999). Group I metabotropic glutamate receptors mediate phospholipase D stimulation in rat cultured astrocytes. *J. Neurochem.* **72**, 1441-1447.

- Sheng ZH, Rettig J, Takahashi M, and Catterall WA (1994) Identification of a syntaxin-binding site on N-type calcium channels. *Neuron* **13**:1303-1313.
- Sheng ZH, Yokoyama CT, and Catterall WA (1997) Interaction of the synprint site of N-type Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> channels with the C2B domain of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:5405-5410.
- Shibata H, Tani A, Chikuhara T, Kikuta R, Sakai M, Ninomiya H, Tashiro N, Iwata N, Ozaki N and Fukumaki Y (2009). Association study of polymorphisms in the group III metabotropic glutamate receptor genes, GRM4 and GRM7, with schizophrenia. *Psychiatry Res.* **167**(1-2):88-96.
- Shigemoto R, Nomura S, Ohishi H, Sugihara H, Nakanishi S, Mizuno N (1993) Immunohistochemical localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in the rat brain. *Neurosci Lett* **163**:53-57
- Shigemoto R, Abe T, Nomura S, Nakanishi S, Hirano T (1994) Antibodies inactivating mGluR1 metabotropic glutamate receptor block long-term depression in cultured Purkinje cells. *Neuron* **12**:1245-1255
- Shigemoto, R., Kinoshita, A., Wada, E., Nomura, S., Ohishi, H., Takada, M., Flor, J.P., Neki, A., Abe, T., Nakanishi, S. and Mizuno, N. (1997). Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* **17**, 7503-7522.
- Shigemoto, R., Kulik, A., Roberts, J.D.B., Ohishi, H., Nusser, Z., Kaneko, T. and Somogyi, P. (1996). Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* **381**, 523-525.
- Shin OH, Lu J, Rhee JS, Tomchick DR, Pang ZP, Wojcik SM, Camacho-Perez M, Brose N, Machius M, Rizo J, Rosenmund C and Südhof TC. (2010). Munc13 C2B domain is an activity-dependent Ca<sup>2+</sup> regulator of synaptic exocytosis. *Nat Struct Mol Biol.* **17**(3):280-8.
- Shinomura T., del Rio E., Breen K.C., Downes C.P. y McLaughlin M. (2000). Activation of phospholipase D by metabotropic glutamate receptor agonists in rat cerebrocortical synaptosomes. *Br. J. Pharmacol.* **131**, 1011-1018
- Silinsky, E.M., and Searl, T.J. (2003). Phorbol esters and neurotransmitter release: more than just protein kinase C? *British journal of pharmacology* **138**, 1191-1201.
- Simen AA and Miller RJ (1998) Structural features determining differential receptor regulation of neuronal Calcium channels. *J Neurosci* **18**:3689-3698.
- Simen AA and Miller RJ (2000) Involvement of regions in domain I in the opioid receptor sensitivity of  $\mu$ 1B Calcium channels. *Mol Pharmacol* **57**:1064-1074.
- Simmons, M. and Chavkin, C. (1996).  $\mu$ -Opioid receptor activation of a dendrotoxin-sensitive potassium channels mediates presynaptic inhibition of mossy fiber neurotransmitter release. *Mol. Pharmacol.* **50**, 80-85.
- Sistiaga A. y Sánchez-Prieto J. (2000a). Protein phosphatase 2B inhibitors mimic the action of arachidonic acid and prolong the facilitation of glutamate release by group I mGlu receptors. *Neuropharmacol.* **39**, 1544-1553.
- Sistiaga A. y Sánchez-Prieto J. (2000b). Protein phosphatase 1 and 2A inhibitors prolong the switch in the control of glutamate release by group I metabotropic glutamate receptors: characterization of the inhibitory pathway. *J. Neurochem.* **75**, 1566-1574.

- Skeberdis VA, Lan J, Opitz T, Zheng X, Bennett MV and Zukin RS. (2001). mGluR1-mediated potentiation of NMDA receptors involves a rise in intracellular calcium and activation of protein kinase C. *Neuropharmacology*. **40(7)**:856-65.
- Sladeczek F., Pin J.P., Recasens M., Bockaert J. y Weiss S. (1985). Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurons. *Nature* **317**, 717-719.
- Slesinger, P.A., Stoffel, M., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1997). Defective gamma-aminobutyric acid type B receptor-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> currents in cerebellar granule cells isolated from weaver and Girk2 null mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 12210-12217.
- Smith, C., Moser, T., Xu, T., and Neher, E. (1998). Cytosolic Ca<sup>2+</sup> acts by two separate pathways to modulate the supply of release-competent vesicles in chromaffin cells. *Neuron* **20**, 1243-1253.
- Smrcka AV and Sternweis PC. (1993). Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C beta by G protein alpha and beta gamma subunits. *J Biol Chem*. **268(13)**:9667-74
- Snead O.C., Banerjee P.K., Burnham M. y Hampson D. (2000). Modulation of absence seizures by the GABA(A) receptor: a critical role for metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4). *J. Neurosci.* **20**, 6218-6224.
- Snelling R. y Nicholls D. (1985). Calcium efflux and cycling across the synaptosomal plasma membrane. *Biochem. J.* **226**, 225-231
- Snutch TP, Peloquin JB, Mathews E, and McRory JE (2005) Molecular properties of voltage-gated calcium channels, in *Voltage-Gated Calcium Channels* (Zamponi GW ed) vol 1, pp 61-94, Georgetown, TX, Landes Bioscience.
- Sodickson, D.L., and Bean, B.P. (1998). Neurotransmitter activation of inwardly rectifying potassium current in dissociated hippocampal CA3 neurons: interactions among multiple receptors. *The Journal of Neuroscience* **18**, 8153-8162
- Somogyi, P., Tamas, G., Luján, R., and Buhl, E.H. (1998). Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev* **26**, 113-135.
- Somogyi P, Dalezios Y, Lujan R, Roberts JD, Watanabe M, Shigemoto R (2003) High level of mGluR7 in the presynaptic active zones of select populations of GABAergic terminals innervating interneurons in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **17**:2503- 2520
- Song, W.J., Tkatch, T., and Surmeier, D.J. (2000). Adenosine receptor expression and modulation of Ca(2+) channels in rat striatal cholinergic interneurons. *Journal of neurophysiology* **83**, 322-332
- Sorensen, S.D., Macek, T.A., Cai, Z., Saugstad, J.A. and Conn, P.J. (2002). Dissociation of protein kinase mediated modulation of metabotropic glutamate receptor 7 (mGluR7) interactions with calmodulin and regulation of mGluR receptor function. *Mol. Pharmacol.* **61**, 1303-1312.
- Stanley EF (2003) Syntaxin I modulation of presynaptic calcium channel inactivation revealed by botulinum toxin C1. *Eur J Neurosci* **17**:1303-1305.
- Stea, A., Soong, T.W. and Snutch, T.P. (1995). Determinants of PKC-dependent modulation of a family of neuronal calcium channels. *Neuron* **15**, 929-940.
- Stefani A., Spadoni F. y Bernardi G. (1996). L-AP4 inhibits high voltage-activated Ca<sup>2+</sup> currents in pyramidal cortical neurones. *Neuroreport* **7**,421-424
- Stefani, A., Spadoni, F., and Bernardi, G. (1998). Group III metabotropic glutamate receptor agonists modulate high voltage-activated Ca<sup>2+</sup> currents in pyramidal neurons of the adult rat. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung* **119**, 237-244

- Stefani MR and Moghaddam B. (2010). Activation of type 5 metabotropic glutamate receptors attenuates deficits in cognitive flexibility induced by NMDA receptor blockade. *Eur J Pharmacol.* **639(1-3)**:26-32.
- Stephens GJ, Canti C, Page KM, and Dolphin AC (1998) Role of domain I of neuronal Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha$ 1 subunits in G protein modulation. *J Physiol (Lond)* **509 (Pt1)**:163-169.
- Stern-Bach Y., Bettler B., Hartley M., Sheppard P.O., O'Hara P.J. and Heinemann S.F. (1994). Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial aminoacid-binding proteins. *Neuron* **13**, 1345-1357.
- Stevens, C.F. and Sullivan, J.M. (1998). Regulation of the readily releasable vesicle pool by protein kinase C. *Neuron* **21**, 885-893.
- Stowell J.N. and Craig A.M. (1999). Axon/dendrite targeting of metabotropic glutamate receptors by their cytoplasmic carboxi-terminal domains. *Neuron* **22**, 525-536.
- Striessnig, J., Knaus, H.G., Grabner, M., Moosburger, K., Seitz, W., Lietz, H., and Glossmann, H. (1987). Photoaffinity labelling of the phenylalkylamine receptor of the skeletal muscle transverse-tubule calcium channel. *FEBS letters* **212**, 247-253.
- Suh PG, Ryu SH, Choi WC, Lee KY, and Rhee SG. Monoclonal antibodies to three phospholipase C isozymes from bovine brain. *J Biol Chem* **263**: 14497-14504, 1988.
- Suh YH, Pelkey KA, Lavezzari G, Roche PA, Huganir RL, McBain CJ and Roche KW. (2008). Corequirement of PICK1 binding and PKC phosphorylation for stable surface expression of the metabotropic glutamate receptor mGluR7. *Neuron.* **58(5)**:736-48.
- Surmeier DJ, Bargas J, Hemmings HC Jr, Nairn AC, and Greengard P (1995) Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* **14**:385-397
- Suzuki G, Tsukamoto N, Fushiki H, Kawagishi A, Nakamura M, et al. 2007. In vitro pharmacological characterization of novel isoxazolyridone derivatives as allosteric metabotropic glutamate receptor 7 antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **323(1)**:147-56
- Suzuki E and Okada T. (2010). Group I metabotropic glutamate receptors are involved in TEA-induced long-term potentiation at mossy fiber-CA3 synapses in the rat hippocampus. *Brain Res.* **1313**:45-52..
- Swartz, K.J., Merritt, A., Bean, B.P. and Lovinger, D.M. (1993). Protein kinase C modulates glutamate receptor inhibition of Ca<sup>2+</sup> channels and synaptic transmission. *Nature* **361**, 165-168.
- Tachibana M and Okada T. (1991). Release of endogenous excitatory amino acids from ON-type bipolar cells isolated from the goldfish retina. *J Neurosci.* **11(7)**:2199-208
- Takahashi, M., and Catterall, W.A. (1987). Identification of an  $\alpha$  subunit of dihydropyridine-sensitive brain calcium channels. *Science (New York), N.Y* **236**, 88-91.
- Takahashi, T. and Momiyama, A. (1993). Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* **366**, 156-158.
- Takahashi, T., Forsythe, I., Tsujimoto, T., Barnes-Davies, M. and Onodera, K. (1996). Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science* **274**, 594-597.
- Takahashi, T., Kajikawa, Y., and Tsujimoto, T. (1998). G-Protein-coupled modulation of presynaptic calcium currents and transmitter release by a GABAB receptor. *J Neurosci.* **18**, 3138- 3146.
- Takahashi, E., Ino, M., Miyamoto, N. & Nagasu, T. (2004). Expression analysis of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels  $\alpha$ 1A subunit mRNA in olfactory mitral cell in N-type Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha$ 1B subunit gene-deficient mice. *Neurosci. Letters*, **359**, 37-40.

- Takao-Rikitsu E, Mochida S, Inoue E, Deguchi-Tawarada M, Inoue M, Ohtsuka T and Takai Y. (2004). Physical and functional interaction of the active zone proteins, CAST, RIM1, and Bassoon, in neurotransmitter release. *J Cell Biol.* **164**(2):301-11
- Takigawa, T., and Alzheimer, C. (1999). G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> (GIRK) currents in dendrites of rat neocortical pyramidal cells. *The Journal of physiology* **517** ( Pt 2), 385-390
- Takigawa, T., and Alzheimer, C. (2002). Phasic and tonic attenuation of EPSPs by inward rectifier K<sup>+</sup> channels in rat hippocampal pyramidal cells. *The Journal of physiology* **539**, 67-75.
- Tamaru Y, Nomura S, Mizuno N, Shigemoto R (2001) Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse CNS: differential location relative to pre- and postsynaptic sites. *Neuroscience* **106**:481-503
- Tamas, G., Lorincz, A., Simon, A., and Szabadics, J. (2003). Identified sources and targets of slow inhibition in the neocortex. *Science (New York) N.Y* **299**, 1902-1910
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., and Numa, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* **328**, 313-31
- Tanabe Y., Masu M., Ishii T., Shigemoto R. y Nakanishi S. (1992). A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* **8**, 169-179.
- Tanabe Y., Nomura A., Masu M., Shigemoto R., Mizuno N. y Nakanishi S. (1993). Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *J. Neurosci.* **13**, 1372-1378.
- Tanaka O and Kondo H.(1994). Localization of mRNAs for three novel members (beta 3, beta 4 and gamma 2) of phospholipase C family in mature rat brain. *Neurosci Lett* **182**: 17-20, 1994.
- Tanaka, C., and Nishizuka, Y. (1994). The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annual review of neuroscience* **17**, 551-567.
- Tang WJ and Gilman AG (1991) Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G rotein  $\beta\gamma$  subunits. *Science (Wash DC)* **254**:1500-1503.
- Tang, E., Yip, P.K., Chapman, A.G., Jane, D.E., and Meldrum, B.S. (1997). Prolonged anticonvulsant action of glutamate metabotropic receptor agonists in inferior colliculus of genetically epilepsy-prone rats. *European journal of pharmacology* **327**, 109-115
- Tareilus, E., Schoch, J., and Breer, H. (1994). GABAB-receptor-mediated inhibition of calcium signals in isolated nerve terminals. *Neurochemistry international* **24**, 349-361
- Tedford, H.W., and Zamponi, G.W. (2006). Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. *Pharmacological reviews* **58**, 837-862
- Thesleff S. (1980). Aminopyridines and synaptic transmission. *Trends Neurosci.* **5**, 1413-1419.
- Thomas N.K., Wright R.A., Howson P.A., Kingston A.E., Schoepp D.D. y Jane D.E. (2001). (S)-3,4-DCPG, a potent and selective mGlu8a receptor agonist, activates metabotropic glutamate receptors on primary afferent terminals in the neonatal rat spinal cord. *Neuropharmacol.* **40**, 311-318.
- Thomsen C. (1996). Metabotropic glutamate receptor subtype 1A activates adenylate cyclase when expressed in baby hamster kidney cells. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **20**, 709-726.
- Thomsen C., Pekhletski R., Haldeman B., Gilbert T.A., O'Hara P. y Hampson D.R. (1997). Cloning and characterization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR4b. *Neuropharmacol.* **36**, 21-30.
- Thompson, S.M., and Gahwiler, B.H. (1992). Comparison of the actions of baclofen at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *The Journal of physiology* **451**, 329-345.



- Tibbs, G.R., Barrie, A.P., Van-Mieghem, F.J.E., McMahon, H.T. and Nicholls, D.G. (1989). Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: effects on cytosolic free calcium and glutamate release. *J. Neurochem.* **53**, 1693-1699.
- Tibbs G.R., Dolly J.O. y Nicholls D.G. (1996). Evidence for the induction of repetitive action potentials in synaptosomes by K<sup>+</sup>-channel inhibitors: an analysis of plasma membrane ion fluxes. *J. Neurochem.* **67**, 389-397
- Tones M.A., Bendali N., Flor P.J., Knopfel T. y Kuhn R. (1995). The agonist selectivity of a class III metabotropic glutamate receptor, human mGluR4a, is determined by the N-terminal extracellular domain. *Neuroreport* **7**, 117-120
- Towers, S., Princivalle, A., Billinton, A., Edmunds, M., Bettler, B., Urban, L., Castro-Lopes, J., and Bowery, N.G. (2000). GABAB receptor protein and mRNA distribution in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *The European journal of neuroscience* **12**, 3201-3210.
- Trinquet, E., Fink, M., Bazin, H., Grillet, F., Maurin, F., Bourrier, E., Ansanay, H., Leroy, C., Michaud, A., Durroux, T., Maurel, D., Malhaire, F., Goudet, C., Pin, J.P., Naval, M., Hernout, O., Chrétien, F., Chapleur, Y. and Mathis, G. (2006). D-myo-inositol 1-phosphate as a surrogate of D-myo-inositol 1,4,5-tris phosphate to monitor G protein-coupled receptor activation. *Anal. Biochem.* **358**, 126-35.
- Trombley, P.Q. and Westbrook, G.L. (1992). L-AP4 inhibits calcium currents and synaptic transmission via a G-protein-coupled glutamate receptor. *J. Neurosci.* **12**, 2043-2050.
- Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR, and Fox AP (1988) Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci* **11**: 431-438.
- Tsuchiya D., Kunishima N., Kamiya N., Jingami H. y Morikawa K. (2002). Structural views of the ligand-binding cores of a metabotropic glutamate receptor complexed with an antagonist and both glutamate and Gd<sup>3+</sup>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 2660-2665.
- Tu, H., Rondard, P., Xu, C., Bertaso, F., Cao, F., Zhang, X., Pin, J.P., and Liu, J. (2007). Dominant role of GABAB2 and Gbetagamma for GABAB receptor-mediated-ERK1/2/CREB pathway in cerebellar neurons. *Cellular signalling* **19**, 1996-2002.
- Turgeon, S.M., and Albin, R.L. (1993). Pharmacology, distribution, cellular localization, and development of GABAB binding in rodent cerebellum. *Neuroscience* **55**, 311-323
- Turner, L.O. and Dunlap, K. (1995). Pharmacological characterization of presynaptic calcium channels using subsecond biochemical measurements of synaptosomal neurosecretion. *Neuropharmacology* **34**, 1469-1478.
- Tyler E.C. and Lovinger D.M. (1995). Metabotropic glutamate receptor modulation of synaptic transmission in corticostriatal co-cultures: role of calcium influx. *Neuropharmacol.* **34**, 939-952.
- Uchino, S., Nakamura, T., Nakamura, K., Nakajima-Iijima, S., Mishina, M., Kohsaka, S., and Kudo, Y. (2001). Real-time, two-dimensional visualization of ischaemia-induced glutamate release from hippocampal slices. *The European journal of neuroscience* **13**, 670-678
- Uezono, Y., Kanaide, M., Kaibara, M., Barzilai, R., Dascal, N., Sumikawa, K., and Taniyama, K. (2006). Coupling of GABAB receptor GABAB2 subunit to G proteins: evidence from *Xenopus* oocyte and baby hamster kidney cell expression system. *American journal of physiology* **290**, C200-207.
- Ugolini A, Corsi M and Bordi F. (1997). Potentiation of NMDA and AMPA responses by group I mGluR in spinal cord motoneurons. *Neuropharmacology.* **36(8)**:1047-55
- Valerio A, Ferraboli S, Paterlini M, Spano PF, Barlati S. 2001. Identification of novel alternatively-spliced mRNA isoforms of metabotropic glutamate receptor 6 gene in rat and human retina. *Gene* **262**(1-2):99-106

- Van Petegem F, Clark KA, Chatelain FC, and Minor DL Jr (2004) Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel  $\alpha$ -subunit and an  $\alpha_1$ -subunit domain. *Nature (Lond)* **429**:671–675.
- Vardi N. y Morigiwa K. (1997). ON cone bipolar cells in rat express the metabotropic receptor mGluR6. *Vis. Neurosci.* **14**, 789-794.
- Varoqueaux F, Sigler A, Rhee JS, Brose N, Enk C, Reim K and Rosenmund C.(2002). Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**(13):9037-42.
- Vázquez, E. and Sánchez-Prieto, J. (1997). Presynaptic modulation of glutamate release targets different calcium channels in rat cerebrocortical nerve terminals. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 2009–2018.
- Vianna, E.P., Ferreira, A.T., Dona, F., Cavalheiro, E.A., and da Silva Fernandes, M.J. (2005). Modulation of seizures and synaptic plasticity by adenosinergic receptors in an experimental model of temporal lobe epilepsy induced by pilocarpine in rats. *Epilepsia* **46 Suppl 5**, 166-173.
- Vendel, A.C., Rithner, C.D., Lyons, B.A., and Horne, W.A. (2006). Solution structure of the N-terminal A domain of the human voltage-gated Ca<sup>2+</sup>-channel beta4a subunit. *Protein Sci* **15**, 378-383.
- Verhage, M., Maia, A.S., Plomp, J.J., Brussaard, A.B., Heeroma, J.H., Vermeer, H., Toonen, R.F., Hammer, R.E., van den Berg, T.K., Missler, M., *et al.* (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science (New Yor)*, N.Y **287**, 864-869
- Vignes M., Clarke V.R., Davies C.H., Chambers A., Jane D.E., Watkins J.C. y Collingridge G.L. (1995). Pharmacological evidence for an involvement of group II and group III mGluRs in the presynaptic regulation of excitatory synaptic responses in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Neuropharmacol.* **34**, 973-982.
- Vigot, R., Barbieri, S., Brauner-Osborne, H., Turecek, R., Shigemoto, R., Zhang, Y.P., Luján, R., Jacobson, L.H., Biermann, B., Fritschy, J.M., *et al.* (2006). Differential compartmentalization and distinct functions of GABAB receptor variants. *Neuron* **50**, 589-601.
- Vogt KE, Nicoll RA (1999) Glutamate and gamma-aminobutyric acid mediate a heterosynaptic depression at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:1118–1122
- von Lubitz, D.K. (1999). Adenosine and cerebral ischemia: therapeutic future or death of a brave concept? *European journal of pharmacology* **371**, 85-102.
- Wada E, Shigemoto R, Kinoshita A, Ohishi H, Mizuno N (1998) Metabotropic glutamate receptor subtypes in axon terminals of projection fibers from the main and accessory olfactory bulbs: a light and electron microscopic immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol* **393**:493–504
- Wang J.K., Walaas S.I., Sihra T.S., Aderem A. y Greengard P. (1989). Phosphorylation and associated translocation of the 87-kDa protein, a major protein kinase C substrate, in isolated nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 2253-2256.
- Wang T, Pentylä S, Elliot J, Dowal L, Gupta E, Rebecchi MJ, and Scarlata S. Selective interaction of the C2 domains of phospholipase C-beta1 and beta2 with activated Gq. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 7843–7846, 1999.
- Wang T, Dowal L, El-Maghrabi MR, Rebecchi M and Scarlata S. (2000). The pleckstrin homology domain of phospholipase C-beta(2) links the binding of gbetagamma to activation of the catalytic core. *J Biol Chem.* **275**(11):7466-9

- Wang, G., Dayanithi, G., Custer, E.E., and Lemos, J.R. (2002). Adenosine inhibition via A(1) receptor of N-type Ca(2+) current and peptide release from isolated neurohypophysial terminals of the rat. *The Journal of physiology* **540**, 791-802.
- Wang Q, Chang L, Rowan MJ and Anwyl R. (2007). Developmental dependence, the role of the kinases p38 MAPK and PKC, and the involvement of tumor necrosis factor-R1 in the induction of mGlu-5 LTD in the dentate gyrus. *Neuroscience*. **144**(1):110-8.
- Wang X, Chen G, Gao W and Ebner T. (2009). Long-term potentiation of the responses to parallel fiber stimulation in mouse cerebellar cortex in vivo. *Neuroscience*. **162**(3):713-22.
- Wardas, J. (2002). Neuroprotective role of adenosine in the CNS. *Polish journal of pharmacology* **54**, 313-326
- Weisskopf, M.G., Castillo, P.E., Zalutski, R.A. and Nicoll, R.A. (1994). Mediation of hippocampal mossy fiber Long-Term potentiation by cyclic AMP. *Science* **265**, 1878-1882.
- Westenbroek, R.E., Hell, J.W., Warner, C., Dubel, S.J., Snutch, T.P., and Catterall, W.A. (1992). Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. *Neuron* **9**, 1099-1115.
- Westenbroek, R.E., Sakurai, T., Elliott, E.M., Hell, J.W., Starr, T.V., Snutch, T.P., and Catterall, W.A. (1995). Immunochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels. *The Journal of Neuroscience* **15**, 6403-6418.
- Westenbroek, R.E., Hoskins, L., and Catterall, W.A. (1998). Localization of Ca2+ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *The Journal of Neuroscience* **18**, 6319-6330.
- Wetherington, J.P., and Lambert, N.A. (2002). Differential desensitization of responses mediated by presynaptic and postsynaptic A1 adenosine receptors. *The Journal of Neuroscience* **22**, 1248-1255
- Wheeler, D.B., Randall, A. and Tsien, R.W. (1994). Roles of N-type and Q-type Ca2+ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* **264**, 107-111.
- White, J.H., Wise, A., Main, M.J., Green, A., Fraser, N.J., Disney, G.H., Barnes, A.A., Emson, P., Foord, S.M., and Marshall, F.H. (1998). Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* **396**, 679-682
- Wickman, K., and Clapham, D.E. (1995). Ion channel regulation by G proteins. *Physiological reviews* **75**, 865-885.
- Wierda, K.D., Toonen, R.F., de Wit, H., Brussaard, A.B. and Verhage, M. (2007). Interdependence of PKC-dependent and PKC-independent pathways for presynaptic plasticity. *Neuron* **54**, 275-290.
- Wilson, R.I. and Nicoll, R.A. (2001). Endogenous cannabinoid mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* **410**, 588-592.
- Wing MR, Houston D, Kelley GG, Der CJ, Siderovski DP and Harden TK. (2001). Activation of phospholipase C-epsilon by heterotrimeric G protein betagamma-subunits. *J Biol Chem*. **276**(51):48257-61.
- Wiser, O., Tobi, D., Trus, M., and Atlas, D. (1997). Synaptotagmin restores kinetic properties of a syntaxin-associated N-type voltage sensitive calcium channel. *FEBS letters* **404**, 203-207.
- Williams M, Francis J, Ghai G, Braunwalder A, Psychoyos S, Stone GA and Cash WD. (1987). Biochemical characterization of the triazoloquinazoline, CGS 15943, a novel, non-xanthine adenosine antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*. **241**(2):415-20

- Wittmann M, Marino MJ, Bradley SR, Conn PJ (2001) Activation of group III mGluRs inhibits GABAergic and glutamatergic transmission in the substantia nigra pars reticulata. *J Neurophysiol* **85**:1960–1968
- Wong, A.Y., Billups, B., Johnston, J., Evans, R.J., and Forsythe, I.D. (2006). Endogenous activation of adenosine A1 receptors, but not P2X receptors, during high-frequency synaptic transmission at the calyx of Held. *Journal of neurophysiology* **95**, 3336–3342.
- Wu D, Jiang H, Katz A, and Simos MI. Identification of critical regions on phospholipase C-beta 1 required for activation by Gproteins. *J Biol Chem* **268**: 3704–3709, 1993.
- Wu, L.-G. and Saggau, P. (1994). Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of hippocampus. *Neuron* **12**, 1139–1148.
- Wu, L.G., and Saggau, P. (1995a). Block of multiple presynaptic calcium channel types by omega-conotoxin-MVIIIC at hippocampal CA3 to CA1 synapses. *Journal of neurophysiology* **73**, 1965–1972.
- Wu, L.-G. and Saggau, P. (1995b). GABA<sub>B</sub> receptor mediated presynaptic inhibition in guinea pig hippocampus is caused by a reduction of presynaptic Ca<sup>2+</sup> influx. *J. Physiol.* **485**, 649–657.
- Wu S., Wright R.A., Rockey P.K., Burgett S.G., Arnold J.S., Rosteck P.R., Johnson B.G., Schoepp D.D. y Belagaje R.M. (1998a). Group III human metabotropic glutamate receptors 4, 7 and 8: molecular cloning, functional expression, and comparison of pharmacological properties in RGT cells. *Mol. Brain Res.* **53**, 88–97.
- Wu L.G., Borst J.G. y Sakmann B. (1998b). R-type Ca<sup>2+</sup> currents evoke transmitter release at a rat central synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 4720–4725.
- Wu, L.-G., Westenbroek, R.E., Borst, J.G.G., Catterall, W.A. and Sakmann, B. (1999). Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single Calyx-type synapses. *J. Neurosci.* **19**, 726–736.
- Wu, X-S., Wu, L-G. (2001). Protein kinase C increases the apparent affinity of the release machinery to Ca<sup>2+</sup> by enhancing the release machinery downstream of the Ca<sup>2+</sup> sensor. *J. Neurosci.* **21**, 7928–7936.
- Xu, J., and Wojcik, W.J. (1986). Gamma aminobutyric acid B receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase in cultured cerebellar granule cells: blockade by islet-activating protein. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **239**, 568–573.
- Yamada M, Mizuguchi M, Rhee SG, and Kim SU. Developmental changes of three phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes in the rat nervous system. *Brain Res* **59**: 7–16, 1991.
- Yang, J., and Tsien, R.W. (1993). Enhancement of N- and L-type calcium channel currents by protein kinase C in frog sympathetic neurons. *Neuron* **10**, 127–136.
- Yang, Y.M., and Wang, L.Y. (2006). Amplitude and kinetics of action potential-evoked Ca<sup>2+</sup> current and its efficacy in triggering transmitter release at the developing calyx of held synapse. *The Journal of Neuroscience* **26**, 5698–5708.
- Yang, S.C., Chiu, T.H., Yang, H.W., and Min, M.Y. (2007). Presynaptic adenosine A1 receptors modulate excitatory synaptic transmission in the posterior piriform cortex in rats. *Brain research* **1156**, 67–79
- Yasuda T, Chen L, Barr W, McRory JE, Lewis RJ, Adams DJ, and Zamponi GW (2004) Auxiliary subunit regulation of high-voltage activated calcium channels expressed in mammalian cells. *Eur J Neurosci* **20**:1–13.
- Yawo, H. and Chuhma, N. (1993). Preferential inhibition of ω-conotoxin-sensitive presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels by adenosine autoreceptors. *Nature* **365**, 256–258.
- Yip, P.K., Meldrum, B.S., and Rattray, M. (2001). Elevated levels of group-III metabotropic glutamate receptors in the inferior colliculus of genetically epilepsy-prone rats following intracollicular administration of L-serine-O-phosphate. *Journal of neurochemistry* **78**, 13–23

- Yokoyama, C.T., Westenbroek, R.E., Hell, J.W., Soong, T.W., Snutch, T.P., and Catterall, W.A. (1995). Biochemical properties and subcellular distribution of the neuronal class E calcium channel  $\alpha$ 1 subunit. *The Journal of Neuroscience* **15**, 6419-6432
- Yokoyama, C.T., Myers, S.J., Fu, J., Mockus, S.M., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2005). Mechanism of SNARE protein binding and regulation of Cav2 channels by phosphorylation of the synaptic protein interaction site. *Molecular and cellular neurosciences* **28**, 1-17.
- Yu, S.P., Sensi, S.L., Canzoniero, L.M., Buisson, A., and Choi, D.W. (1997). Membrane-delimited modulation of NMDA currents by metabotropic glutamate receptor subtypes 1/5 in cultured mouse cortical neurons. *The Journal of physiology* **499** ( Pt 3), 721-732
- Zamponi, G.W., Bourinet, E., Nelson, D., Nargeot, J. and Snutch, T.P. (1997). Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel  $\alpha$ 1 subunit. *Nature* **385**, 442-446.
- Zhai J, Tian MT, Wang Y, Yu JL, Koster A, et al. 2002. Modulation of lateral perforant path excitatory responses by metabotropic glutamate 8 (mGlu8) receptors. *Neuropharmacology* **43**(2):223-30
- Zhang, J.F., Ellinor, P.T., Aldrich, R.W. and Tsien, R.W. (1996). Multiple structural elements in voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels support their inhibition by G proteins. *Neuron* **17**, 991-1003.
- Zhang, C., and Schmidt, J.T. (1998). Adenosine A1 receptors mediate retinotectal presynaptic inhibition: uncoupling by C-kinase and role in LTP during regeneration. *Journal of neurophysiology* **79**, 501-510
- Zhang, Y.H., Kenyon, J.L. and Nicol, G.D. (2001). Phorbol ester-induced inhibition of potassium currents in rat sensory neurons requires voltage-dependent entry of calcium. *J. Neurophysiol.* **85**, 362-373.
- Zhang, C-S., Bertaso, F., Eulenburg, V., Lerner-Natoli, M., Herin, G.A., Bauer, L., Bockaert, J., Fagni, L., Betz, H. and Scheschonka, A. (2008). Knock-in mice lacking the PDZ-ligand motif of mGluR7a show impaired PKC-dependent autoinhibition of glutamate release, spatial working memory deficits, and increased susceptibility to pentylenetetrazol. *J. Neurosci.* **28**, 8604-8614.
- Zhou Y, Wing M, John Sondek J, and Hardez K Y. (2005) Molecular cloning and characterization of phospholipase C- $\eta$ 2. *Biochem. J.* **391** (667-676).